



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**



**MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**Risco de introdução de novas espécies de *Leishmania* na  
Região do Algarve**

**Joana Teixeira da Silva Mendonça**

**2011**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**



# **Risco de introdução de novas espécies de *Leishmania* na Região do Algarve**

**Joana Teixeira da Silva Mendonça**

Tese apresentada para a obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Biomédicas

**Orientador:**

**Professora Doutora Maria Odete Afonso**

**Co-Orientador:**

**Doutora Carla Maia**

**2011**

Este trabalho foi realizado na Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Leishmanioses, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL), sob Orientação da Professora Doutora Maria Odete Afonso, UEI Entomologia Médica, IHMT, UNL e Co-orientação da Doutora Carla Maia, UEI Leishmanioses, IHMT, UNL. O financiamento foi concedido através do projecto POCI/CVT/56357/2004 aprovado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior e pelo POCI, participado pelo fundo comunitário europeu FEDER.

## AGRADECIMENTOS

Muitos são os nomes que tenho em mente para agradecer, porque nada na vida se faz sozinho! Esta vida de trabalhador-estudante não é fácil, existem alturas que nos parece que o Mundo está contra nós, porque o que é suposto dar, não deu, porque não temos tempo, porque temos de encontrar soluções para ultrapassar barreiras e obstáculos e quando por fim, olhamos à nossa volta, sentimos que estamos a ser privilegiados, sentimo-nos realizados por estar a atingir mais uma etapa importante da nossa vida... O Mestrado!

MUITO OBRIGADA...

À grande impulsionadora e responsável, por este estudo, Doutora Carla Maia, da Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Leishmanioses, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL) que foi não só uma Co-orientadora excepcional, mas também uma das melhores pessoas que conheci ultimamente! “Carlinha”, obrigada por teres partilhado comigo os bons e os maus momentos, todos os conhecimentos transmitidos sobre *Leishmania* e que mesmo à distância sempre demonstraste uma constante disponibilidade “on line”, por todas as dúvidas esclarecidas e por me teres incentivado. Mesmo que tente, não há palavras para descrever a minha gratidão!

À minha Orientadora, Professora Doutora Maria Odete Afonso, da UEI de Entomologia Médica, IHMT, UNL, pela empatia, por ter partilhado comigo um pouco do seu vasto conhecimento e experiência sobre *Phlebotomus*, pela identificação entomológica dos flebótomos capturados, pelo apoio, pela preocupação, pelo rigor científico, por não ter ido de férias de Natal para fazer as correcções da tese...

À Senhora Professora Doutora Lenea Campino, Professora Catedrática e Directora da UEI de Leishmanioses, IHMT, UNL, por me ter acolhido, por me ter dado oportunidade de conhecer melhor as “*Leishmanias*”, pela sua boa disposição e pela valorização e formação científica que me proporcionou.

À Senhora Professora Doutora Maria Amélia Grácio, Professora Catedrática da UEI de Helminologia, IHMT, UNL, Coordenadora do III Mestrado de Ciências Biomédicas do IHMT, UNL, e ao Professor Doutor Celso Cunha da UEI de Biologia Molecular, IHMT, UNL, actual Coordenador do III Mestrado de Ciências Biomédicas, pela óptima gestão pedagógica que definiram, assim como pela disponibilidade e incentivo que sempre manifestaram.

Ao Técnico de Diagnóstico e Terapêutica José Manuel Cristóvão, da UEI de Leishmanioses, IHMT, UNL, por ter sido o meu “ pilar laboratorial”, o meu braço direito e esquerdo na realização da parte prática deste estudo, sempre disponível e cheio de paciência para as minhas perguntas existenciais.

A Professora Doutora Lúcia Dionísio e ao Professor Doutor Luís Neto, da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve, pela captura dos flebótomos.

Ao Técnico João Ramada, à Sofia e à Mónica, da UEI de Leishmanioses, IHMT, UNL, pela simpatia e pelos convites para lanchinhos!

Ao Hugo, pela companhia, por aturares os meus *stresses*, pela ajuda informática mesmo sem perceberes nada do conteúdo, pela compreensão da minha falta de tempo... E principalmente por existires!

Aos meus Pais, pelo carinho, apoio, repeito pelas minhas decisões e por me motivarem a querer ir mais longe.

Aos meus Colegas de Mestrado, aos meus Amigos e Amigas de Cacilhas e aos meus Colegas de Trabalho, por me apoiarem e compreenderem as minhas ausências.

POR TUDO...

# ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	II
ÍNDICE GERAL.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Referência histórica.....	1
1.2. Os Parasitas .....	2
1.2.1. Posição sistemática do género <i>Leishmania</i> .....	2
1.2.2. Morfologia e Fisiologia.....	3
1.3. Os Hospedeiros.....	4
1.3.1. Os hospedeiros invertebrados: Vectores .....	4
1.3.1.1. Características morfológicas do vector.....	4
1.3.1.2. Distribuição, ciclo de vida, bioecologia geral dos flebótomos e comportamento do vector .....	5
1.3.1.3. Comportamento vectorial .....	7
1.3.2. Os hospedeiros vertebrados: Reservatórios .....	8
1.4. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. nos hospedeiros .....	11
1.4.1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. no hospedeiro vertebrado.....	12
1.5. Epidemiologia das leishmanioses.....	15
1.6. Manifestações Clínicas.....	17
1.6.1. Leishmaniose visceral.....	17
1.6.2. Leishmaniose cutânea .....	19
1.6.3. Leishmaniose mucocutânea .....	21
1.7. Leishmanioses na Europa.....	22
1.8. Leishmanioses em Portugal.....	24
1.8.1. Focos de leishmaniose em Portugal .....	25
1.8.1.1. Região do Alto Douro.....	26
1.8.1.2. Região Metropolitana de Lisboa.....	26

1.8.1.3.	Região do Algarve .....	27
1.8.2.	Distribuição dos vectores de <i>Leishmania</i> em Portugal .....	28
1.9.	Identificação da infecção por <i>Leishmania</i> nos flebotómicos fêmeas .....	28
1.10.	Identificação das refeições hemáticas de fêmeas flebotómicas .....	30
1.11.	Medidas de controlo das leishmanioses .....	31
II.	OBJECTIVOS .....	34
III.	MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.1.	Área de estudo .....	35
3.2.	Captura dos flebótomos .....	36
3.3.	Identificação morfológica dos flebótomos capturados .....	37
3.4.	Pesquisa de infecção por <i>Leishmania</i> nos flebótomos através de reacção de PCR .....	38
3.4.1.	Extracção de DNA .....	38
3.4.2.	Reacção de PCR .....	38
3.4.2.1.	Sequências iniciadoras cinetoplastideais .....	38
3.4.2.2.	Sequências iniciadoras ribossomais .....	39
3.4.3.	Visualização dos produtos de PCR .....	40
3.5.	Identificação das preferências hemáticas dos flebótomos fêmeas através de reacção de PCR .....	41
3.5.1.	Purificação dos produtos amplificados por PCR .....	41
3.5.2.	Sequenciação dos produtos de PCR purificados .....	42
IV.	RESULTADOS .....	43
4.1.	Abundância relativa das espécies flebotómicas capturadas na Região do Algarve .....	45
4.2.	Associação das espécies flebotómicas .....	47
4.3.	Densidades das espécies flebotómicas .....	47
4.4.	<i>Phlebotomus (Larroussius) perniciosus</i> Newstead, 1917 .....	48
4.4.1.	Distribuição geográfica .....	48
4.4.2.	Densidade flebotómica .....	48
4.4.3.	Associação de espécies .....	49
4.5.	<i>Phlebotomus (Larroussius) ariasi</i> Tonnoir, 1921 .....	49
4.5.1.	Distribuição geográfica .....	49
4.5.2.	Densidade flebotómica .....	49
4.5.3.	Associação de espécies .....	50
4.6.	<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti</i> Parrot, 1917 .....	50
4.6.1.	Distribuição geográfica .....	50

4.6.2.	Densidade flebotomínica.....	51
4.6.3.	Associação de espécies .....	51
4.7.	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta</i> Rondani, 1843.....	51
4.7.1.	Distribuição geográfica .....	51
4.7.2.	Densidade flebotomínica.....	52
4.7.3.	Associação de espécies .....	52
4.8.	Pesquisa de infecção por <i>Leishmania</i> nos flebótomos capturados.....	53
4.9.	Análise das refeições sanguíneas das fêmeas capturadas.....	54
V.	DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	56
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – A: Forma amastigota de <i>Leishmania</i> spp. B: Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. C: Representação esquemática das formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp .....	3
Figura 2 – Flebótomo fêmea sobre a pele de um hospedeiro vertebrado .....	5
Figura 3 - Ciclo biológico de <i>Phlebotomus perniciosus</i> .....	6
Figura 4 – Esquema do ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	11
Figura 5 – Desenvolvimento intravectorial de <i>Leishmania</i> spp.....	15
Figura 6 – Criança com leishmaniose visceral.....	17
Figura 7 – Distribuição geográfica da leishmaniose visceral.....	19
Figura 8 – Leishmaniose cutânea.....	20
Figura 9 – Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no Velho Mundo provocada por <i>L. major</i> .....	20
Figura 10 – Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no Velho Mundo provocada por <i>L. tropica</i> .....	20
Figura 11 – Leishmaniose mucocutânea.....	21
Figura 12 – Leishmanioses na Região Norte da Bacia Mediterrânica. Distribuição das leishmanioses cutânea e visceral humanas autóctone e importada. Leishmaniose canina na Europa.....	23
Figura 13 – Prevalência da leishmaniose canina em Portugal, segundo o Observatório Nacional das Leishmanioses.....	26
Figura 14 – Localização geográfica da Região Algarvia.....	35
Figura 15 – Região do Algarve.....	43
Figura 16 – Densidade de <i>P. perniciosus</i> na Região do Algarve de Março a Novembro de 2007..	48
Figura 17 – Densidade de <i>P. ariasi</i> na Região do Algarve de Março a Novembro de 2007.....	50
Figura 18 – Densidade de <i>P. sergenti</i> na Região do Algarve de Março a Novembro de 2007.....	51
Figura 19 – Densidade de <i>S. minuta</i> na Região do Algarve de Março a Novembro de 2007.....	52

Figura 20 – Fotografia de gel de agarose onde migraram, por electroforese, produtos de amplificação de PCR com sequências iniciadoras MC.....	53
Figura 21 – Fotografia de gel de agarose onde migraram, por electroforese, produtos de amplificação de PCR com sequências iniciadoras universais cyt B.....	54

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I – <i>Leishmania</i> spp. Patologia, vectores, distribuição geográfica, reservatórios e tipo de transmissão das leishmanioses.....	10
Quadro II – Distribuição das localidades, por concelhos, onde foram colocadas armadilhas para captura de flebótomos na Região Algarvia.....	37
Quadro III – Sequências iniciadoras e condições dos ensaios de PCR utilizados neste estudo....	40
Quadro IV – Caracterização da vegetação e dos animais presentes nas localidades estudadas....	44
Quadro V – Número total das espécies flebotomínicas capturadas por concelhos e localidades.	46
Quadro VI – Densidades das espécies flebotomínicas na Região do Algarve, de Março a Novembro de 2007.....	47

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Número total de flebótomos capturados na Região do Algarve e abundância relativa das espécies.....	45
Tabela 2 – Associações das espécies de flebótomos capturadas com as armadilhas luminosas CDC.....	47
Tabela 3 – Número de fêmeas grávidas e com refeições sanguíneas, por espécie, capturadas na Região do Algarve.....	54
Tabela 4 – Identificação das fontes de alimentação das fêmeas de flebótomos.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**%** – Percentagem

**°C** – Grau Celsius

**mM** – Milimolar

**µm** – Micrómetro

**pm** – Picomolar

**cyt B** – Citocromo B mitocondrial

**DDT** – Dicloro-Difenil-Tricloroetano

**DGS** – Direcção-Geral de Saúde

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”

**dNTP** – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

**HAART** – “Highly active antiretroviral therapy”

**HIV** – Vírus da imunodeficiência humana, do inglês “Human Immunodeficiency Virus”

**IFI** – Imunofluorescência indirecta

**IHMT** – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**ITS** – Espaçadores internos transcritos, do inglês “Internal transcribed spacers”

**kDNA** – DNA cinetoplastideal

**Km** – Quilómetro

**LC** – Leishmaniose cutânea

**LCan** – Leishmaniose canina

**LF** – Leishmaniose felina

**LMC** – Leishmaniose mucocutânea

**LPG** – Lipofosfoglicano glicoconjugado

**LV** – Leishmaniose visceral

**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de magnésio

**NaCl** – Cloreto de sódio

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**pb** – Pares de Bases

**PBS** – Tampão fosfato salino, do inglês “Phosphate-buffered saline”

**PCR** – Reacção em cadeia da polimerase, do inglês “Polymerase chain reaction”

**PSG** – Gel secretório promastigota, do inglês “Secretory promastigote gel”

**RA** – Região do Algarve

**RAD** – Região do Alto Douro

**RML** – Região metropolitana de Lisboa

**RNA** – Ácido ribonucleico, do inglês “Ribonucleic acid”

**rRNA** – Ácido ribonucleico ribossómico

**SIDA** – Síndrome de imunodeficiência adquirida

**SSU** – Pequena subunidade, do inglês “Small subunit”

**TAE** – Tampão tris-acetato-EDTA

**Tris-HCl** – Tris (hidroximetilo) aminometano – ácido clorídrico

**UEI** – Unidade de Ensino e Investigação

**UNL** – Universidade Nova de Lisboa

**WHO** – Organização Mundial de Saúde, do inglês “World Health Organization”

## RESUMO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do género *Leishmania*, transmitidas pela picada de flebótomos fêmeas e que causam uma elevada morbilidade e mortalidade em África, América Latina, Ásia, e na Região Mediterrânica. A vigilância da prevalência das leishmanias e dos respectivos vectores, nas regiões endémicas e envolventes, são cruciais para prever o risco de introdução e disseminação de novas espécies de *Leishmania* que poderão dar origem a novos focos de doença(s). A monitorização da infecção por *Leishmania* nos flebótomos é importante para a compreensão da eco-epidemiologia e avaliação de programas de controlo. Por outro lado, a transmissão de *Leishmania* pode envolver um elevado número de hospedeiros vertebrados que podem ser identificados através da análise das refeições hemáticas dos vectores.

A Região do Algarve é considerada um foco endémico de leishmaniose(s), humana e canina, desde a década de 1980. O principal objectivo deste estudo foi actualizar a distribuição, a abundância relativa, a densidade e outros aspectos vectoriais das espécies flebotomínicas na Região Algarvia para uma possível aplicação na vigilância epidemiológica.

De Maio a Novembro de 2007, foram capturados 1595 flebótomos, de ambos os sexos, através de armadilhas luminosas tipo CDC, em 175 biótopos. Foram identificadas quatro espécies flebotomínicas: *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti* e *Sergentomyia minuta*. Após identificação realizaram-se PCRs com alvo no (i) kDNA e na região ITS-1 para detecção da presença de DNA de *Leishmania* nos flebótomos e (ii) gene do citocromo B mitocondrial para análise das refeições hemáticas.

A presença de uma fêmea de *P. perniciosus* infectada com *L. infantum* (taxa de infecção total de 0,12%) demonstrou que o Algarve continua a ser um foco de leishmaniose.

A presença de *P. sergenti* e *P. papatasi* (esta última, encontrada em estudos anteriores) poderão constituir indicadores de risco de introdução/disseminação de *L. tropica* e *L. major* devido à mobilidade de turistas e imigrantes (e outros) de áreas endémicas para esta região.

A realização, pela primeira vez em Portugal, de uma técnica de biologia molecular para estudo das preferências hemáticas, demonstrou ser uma ferramenta útil, que no futuro poderá eventualmente contribuir para verificar se os vectores apresentam capacidade de adaptação a novos hospedeiros vertebrados.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by an intracellular protozoan belonging to the genus *Leishmania*, which is transmitted between mammalian hosts by phlebotomine sand flies. Leishmaniases are responsible for significant morbidity and mortality in Africa, Asia, Latin America and the Mediterranean basin. Surveillance of *Leishmania* prevalence and respective vector species in endemic and surrounding areas is important for predicting the risk and dissemination of the disease. Monitoring *Leishmania* infection in sand flies is important for understanding the eco-epidemiology of leishmaniasis and to assess the impact of control programs. On the other hand, *Leishmania* may have a large number of vertebrate reservoir hosts, so blood meal identification is important to determine host preferences and vectorial capacity of the insect vectors.

The Algarve Region in Southern Portugal has been considered an endemic focus of leishmaniasis since 1980s. The main objectives of the present study were to update the distribution, relative relative abundance, density and other vectorial aspects of sand fly species in the Algarve Region for a possible application in epidemiological surveillance.

From May until November 2007, in the Algarve Region, 1595 sand flies from both genders were captured in 175 biotopes by CDC light-traps. Four species were identified: *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti* and *Sergentomyia minuta*. After morphological species identification, PCR amplification of (i) kDNA and ITS-1 was used to detect the presence of *Leishmania* DNA in female sand flies and of (ii) cytochrome B for blood meal identification of fed females.

One *P. perniciosus* was found infected with *L. infantum* (reflecting an overall infection rate of 0,12%), which shows that the Algarve continues to be an endemic focus of leishmaniasis.

The presence of *P. sergenti*, and *P. papatasi* (although only found in previous studies), may be indicators of risk of introduction/spread of *L. tropica* or *L. major* due to the mobility of tourists and immigrants (and others) from endemic areas towards this region.

PCR, used here for the first time in Portugal to study blood meal preferences, proved to be a very useful tool, which, if used in surveillance, may indicate possible adaptation to new vertebrate hosts.



# I. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias complexas e multifacetadas causadas por mais de vinte espécies de protozoários pertencentes ao género *Leishmania* (Bañuls *et al.*, 2007), transmitidas por insectos vectores e que afectam vários tipos de hospedeiros vertebrados. A sua maior importância deve-se à capacidade de causar doença(s) nos humanos e cães. Apresentam uma ampla distribuição geográfica, estando presentes em todos os Continentes com excepção da Antárctida (WHO, 1990; Desjeux, 1992).

## 1.1. Referência histórica

O termo “leishmaniose” surgiu depois de William Boog Leishman (1865-1926), um médico de Glasgow director do serviço médico da “British Army” na Índia, desenvolver uma das colorações para *Leishmania* (corante de Leishman) em 1901, através da qual conseguiu identificar o parasita. Em Dum Dum, uma cidade perto de Calcutá, Leishman descobriu corpos ovóides (pequenas partículas dentro de macrófagos) em esfregaços de um baço de um soldado britânico, que padecia de acessos de febre, anemia, atrofia muscular e aumento do tamanho do baço. Leishmann descreveu esta doença como “Dum Dum fever” e publicou as suas descobertas em 1903. Um outro investigador, Charles Donovan (1863-1951) reconheceu os mesmos sintomas em outros pacientes com kala-azar (termo que significa “febre negra” e utilizado por médicos indianos para designar a leishmaniose visceral no Homem) e publicou as suas descobertas algumas semanas depois de Leishman. Depois de examinar o parasita usando a coloração de Leishman, estes amastigotas ficaram conhecidos como corpos Leishman-Donovan e oficialmente, estas espécies tornaram-se conhecidas como *L. donovani*. A relação entre estes microrganismos e o Kala-azar foi descoberta pelo Major Ross, que propôs a criação de um novo género, o género *Leishmania* (Beaver *et al.*, 1984).

## 1.2. Os Parasitas

### 1.2.1. Posição sistemática do género *Leishmania*

O género *Leishmania* Ross, 1903 classifica-se do seguinte modo (Basano & Camargo, 2004):

Reino: **Protista** Haeckel, 1866

Sub-reino: **Protozoa** Goldfuss, 1817

Filo: **Sarcomastigophora** Honigberg & Balamuth, 1963

Sub-filo: **Mastigophora** Deising, 1866

Classe: **Zoomastigophorea** Calkins, 1909

Ordem: **Kinetoplastida** Honigberg, 1963, *emend.* Vickerman, 1976

Sub-ordem: **Trypanosomatina** Kent, 1880

Família: **Trypanosomatidae** Dofein, 1901, *emend.* Grobben 1905

Género: ***Leishmania*** Ross, 1903

O género *Leishmania* divide-se em subgénero *Leishmania* e subgénero *Viannia*. Dentro destes dois subgéneros individualizam-se diversos complexos filogenéticos, que incluem uma ou mais espécies de *Leishmania* (WHO, 1990; Dedet, 2000).

Apesar de inicialmente a classificação destes parasitas ter sido baseada em critérios extrínsecos aos mesmos, tais como, as manifestações clínicas das doenças, distribuição geográfica, hospedeiros habituais, entre outros, actualmente, utilizam-se critérios intrínsecos aos parasitas (metabólicos e genómicos) para a sua classificação.

Em relação aos critérios metabólicos, o estudo das enzimas tem-se revelado decisivo para a identificação e classificação das espécies de *Leishmania*. O ponto de partida é o zimodeme, que corresponde a um conjunto de leishmanias que apresentam o mesmo padrão isoenzimático de migração electroforética.

### 1.2.2. Morfologia e Fisiologia

As leishmanias apresentam-se em dois estados diferentes: promastigota no insecto vector (flebótomo) e amastigota no hospedeiro vertebrado. A forma promastigota apresenta um flagelo bem desenvolvido na região anterior e é extra-celular. O seu tamanho varia entre os 10-30  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5-3  $\mu\text{m}$  de largura. O cinetoplasto nos promastigotas, situa-se entre o núcleo e o flagelo, e é a presença deste flagelo bem desenvolvido que lhes confere mobilidade. As formas amastigotas encontram-se no interior dos macrófagos e células do sistema mononuclear fagocítico dos vertebrados, apresentando um corpo mais arredondado com 4  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2  $\mu\text{m}$  de largura. No meio do citoplasma observam-se dois organelos: o núcleo, relativamente grande e situado no pólo posterior da célula, e o cinetoplasto, mais pequeno, em forma de bastonete, pouco visível e em posição anterior relativamente ao núcleo. O cinetoplasto contém uma quantidade importante de DNA (kDNA) e prolonga a única mitocôndria celular. A forma amastigota também possui um envelope flagelar (blefaroplasto) que contém os rudimentos do flagelo (Antoine, 1994; Bourdeau, 1983) (Figura 1).



Figura 1 – A: Forma amastigota de *Leishmania* spp. B: Formas promastigotas de *Leishmania* spp. C: Representação esquemática das formas evolutivas da *Leishmania* spp; promastigota flagelado no exterior e amastigota no interior de um macrófago.

(Adaptado de: [http://www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila\\_on\\_line/origem\\_classificacao.htm](http://www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila_on_line/origem_classificacao.htm))

## 1.3. Os Hospedeiros

### 1.3.1. Os hospedeiros invertebrados: Vectores

Os vectores naturais de *Leishmania* são insectos dípteros pertencentes à Família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Rioux *et al.*, 1969; Killick-Kendrick *et al.*, 1991), que é constituída por vários géneros, sendo as espécies pertencentes ao género *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1843 responsáveis pela leishmaniose no Velho Mundo<sup>1</sup> e as do género *Lutzomyia* França, 1924 no Novo Mundo<sup>2</sup>, verificando-se uma elevada especificidade entre a espécie de *Leishmania* infectante e a espécie do insecto vector (Campino & Abranches, 2002).

A primeira referência a estes insectos como vectores de *Leishmania* foi feita em 1904 na Argélia pelos irmãos Sergent, e mais tarde em 1913 por Mackie na Índia (Sergent *et al.*, 1933).

Existem cerca de 1000 espécies flebotomínicas, das quais, aproximadamente 70 são suspeitas de serem vectoras de *Leishmania* e 20 já foram confirmadas como vectoras eficientes, ou seja, capazes de transmitirem o parasita de animal para animal, de animal para o Homem e de Homem para Homem (Leger & Depaquit, 1999).

#### 1.3.1.1. Características morfológicas do vector

Os flebótomos são dípteros muito pequenos com 2 a 3 milímetros de comprimento, a cor varia entre o castanho e o cinzento-escuro, as antenas são subiguais em ambos os sexos e constituídas por 16 segmentos, os palpos são longos com 5 artículos, o aparelho bucal na fêmea é picador-sugador, as asas são lanceoladas e bastantes pilosas, com 6 nervuras longitudinais, sendo a 2ª nervura bifurcada duas vezes e, quando o insecto está em repouso, ficam abertas sobre o abdómen em forma de V. O abdómen apresenta 10 segmentos e verifica-se dimorfismo sexual acentuado (Killick-Kendrick, 1999) (Figura 2).

---

<sup>1</sup> Termo generalizado que define o Mundo conhecido pelos europeus até ao séc. XV, ou seja, os Continentes Europeu, Africano e Asiático e ilhas adjacentes.

<sup>2</sup> Designação atribuída ao Continente Americano pelos europeus na época do seu descobrimento.



Figura 2 – Flebótomo fêmea sobre a pele de um hospedeiro.

(Adaptado de: <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/vector.html>)

#### **1.3.1.2. Distribuição, ciclo de vida, bioecologia geral dos flebotomos e comportamento do vector**

As diferentes espécies flebotomínicas distribuem-se numa vasta área do Mundo, nomeadamente nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, entre latitudes 50° Norte e 40° Sul e altitudes compreendidas entre o nível do mar e os 2.800 metros (Quénia e Andes), coincidindo com as regiões onde as espécies de *Leishmania* são endémicas (Killick-Kendrick, 1990). Contudo, podem não apresentar distribuição contínua por esta estar condicionada ao tipo de vegetação, clima, composição dos solos e hospedeiros vertebrados preferenciais (Lewis, 1978). Por outro lado, a distribuição das diferentes espécies de flebotomos pode não coincidir com a distribuição de *Leishmania* spp.

No seu ambiente natural, os adultos repousam durante o dia nas fendas das rochas, buracos nos muros, troncos de árvores, abrigos de animais, grutas e outros.

A actividade flebotomínica é principalmente crepuscular ou nocturna, dependendo das espécies e da época do ano, cessando entre os 12° e os 16°C (Guernaoui *et al.*, 2006).

Os ovos das fêmeas são postos em grande número, sendo o período de incubação cerca de dez a doze dias. A postura é efectuada em lugares sombrios, em solo ligeiramente húmido e com matéria orgânica, nomeadamente em toca de roedores, grutas, galinheiros, buracos nos muros e outros. A eclosão das larvas ocorre após cinco a quinze dias. Depois deste processo, as larvas passam por quatro estados larvares (L1 a L4) (Antoine, 1994) até à sua transformação em pupa, variando este período com a temperatura, fotoperíodo e alimentação (Pires, 2000). A passagem de ovo a adulto completa-se em cerca de 45 dias dependendo das condições climáticas e ambientais (Lanotte *et al.*, 1979; Antoine, 1994) (Figura 3).

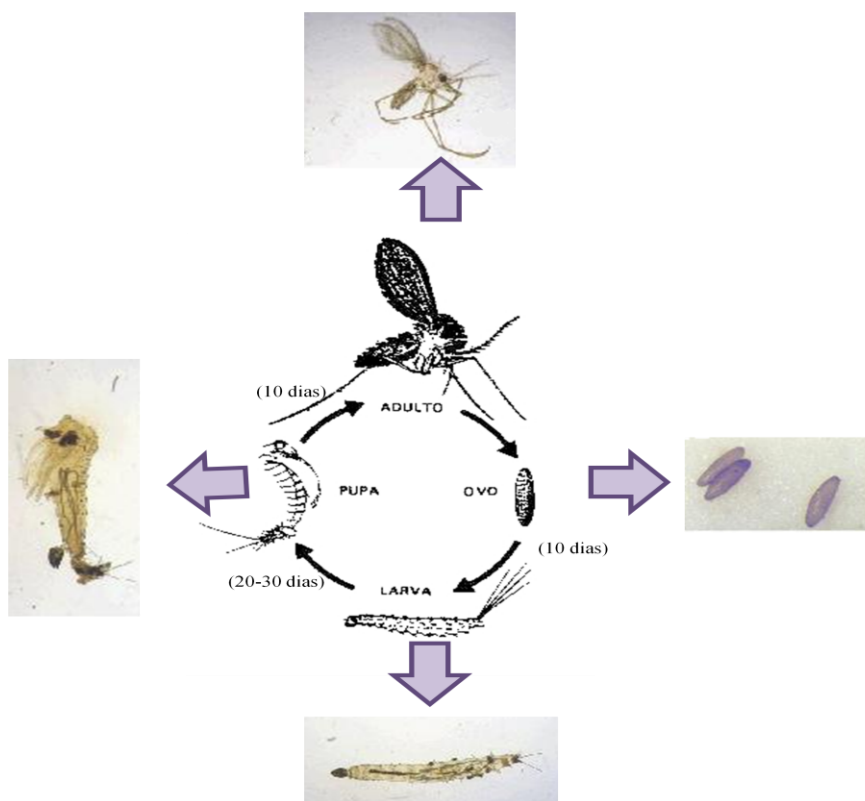


Figura 3 - Ciclo biológico de *Phlebotomus perniciosus*.

(Adaptado de: [http://jcastella.uab.cat/practiques/Insectes\\_Gal.html](http://jcastella.uab.cat/practiques/Insectes_Gal.html) e <http://www.azuljasmim.info/Forum2009/index.php?topic=1087.0>)

Quer os machos, quer as fêmeas, são fitófagos, ou seja, alimentam-se de sucos vegetais ou açúcares provenientes de plantas ou de outros insectos para obterem a energia necessária à sua sobrevivência (Schlein & Warburg, 1986; Killick-Kendrick, 1987). Porém, as fêmeas alimentam-se de sangue de vertebrados, que é fundamental para suprir as carências necessárias para a ovogénese. Dependendo da temperatura e da humidade, a longevidade natural dos flebótomos pode variar, de forma a conseguirem completar três a quatro ciclos gonotróficos, com eventual transmissão do parasita a partir do segundo ciclo (Bodet, 1991). As preferências alimentares destes insectos variam, dentro da mesma espécie, consoante a região em que se encontrem, assim, umas populações são mais antropofílicas e outras são mais zoofílicas.

A picada das fêmeas flebotomínicas dura poucos minutos e são considerados insectos telmofágicos (“pool feeding”). Possuem um voo silencioso, normalmente de baixa altitude e uma capacidade de voo de poucos quilómetros (um a dois). Em climas temperados, a sua actividade vai desde a Primavera até finais de Outono (Lanotte *et al.*, 1979; Rioux *et al.*, 1985; Antoine, 1994). O número de gerações anuais é de um a dois em climas temperados e de cinco a sete em climas subtropicais ou tropicais.

### 1.3.1.3. Comportamento vectorial

Os flebótomos apresentam susceptibilidade e competência vectorial a uma ou mais espécies de *Leishmania*, quando têm capacidade de se infectarem, ao alimentarem-se em hospedeiros infectados, e de se tornarem infectantes, transmitindo posteriormente por picada, os parasitas aos hospedeiros vertebrados, sejam eles reservatórios ou hospedeiros acidentais. O vector é o agente focalizador da doença (Rioux *et al.*, 1969).

A existência de focos zoonóticos ou antroponóticos está limitada à presença do vector específico do parasita, à distribuição, à capacidade de dispersão, à existência de hospedeiros vertebrados infectados e às condições climáticas. A susceptibilidade de uma espécie vectora a uma espécie de *Leishmania* está então condicionada por numerosos factores, quer extrínsecos (factores ambientais em geral), quer intrínsecos (inter-relação vector-parasita).

O desenvolvimento do parasita no vector e o ciclo de vida de diferentes espécies flebotomínicas são, por sua vez, sensíveis às condições do ambiente, tais como, a temperatura, a humidade e a pluviosidade. O aumento da temperatura ambiental poderá aumentar o período de actividade dos adultos, o número de gerações por ano, a densidade do vector e diminuir o período de incubação intrínseco (desenvolvimento do parasita no vector). Todos estes factores poderão conduzir, no futuro, a um maior risco de transmissão do parasita pelo(s) vector(es) (Calheiros *et al.*, 2006).

Devido às alterações climáticas, assiste-se a uma mudança da distribuição dos vectores, que já se encontram mais para Norte e em altitudes mais elevadas (WHO, 2000a). Temperaturas mais elevadas fazem prolongar a actividade do vector e diminuir o seu período de diapausa, no estado larvar, o que pode aumentar o número de gerações por ano. Por outro lado, podem acelerar a maturação intravectorial do protozoário, levando a um possível aumento do risco de transmissão de *Leishmania* (McCarthy *et al.*, 2001).

### 1.3.2. Os hospedeiros vertebrados: Reservatórios

Um reservatório é uma espécie animal que na natureza é fonte de infecção de um determinado parasita. A ecologia de *Leishmania* spp. está, inevitavelmente, associada aos seus hospedeiros, de modo que todos os factores que afectem a sobrevivência e o comportamento destes, interferem no ciclo de transmissão do parasita. As leishmanioses, na sua maioria, são zoonoses, em que espécies distintas de vertebrados actuam como reservatórios do parasita para os seres humanos. Inicialmente eram parasitoses de animais selvagens. Todavia, com a introdução accidental do Homem no ciclo bio-epidemiológico do parasita (ciclo zoonótico ou primário), e ao desaparecer o reservatório selvagem do meio humano juntamente com a adopção de animais domésticos susceptíveis, deu origem às leishmanioses de carácter zooantroponótico ou secundário. Finalmente, existem situações em que o reservatório animal desaparece e o Homem actua como único hospedeiro vertebrado, num ciclo antroponótico ou terciário (Desjeux, 2004).

As leishmanioses apresentam quatro principais entidades eco-epidemiológicas: leishmaniose visceral (LV) zoonótica e antroponótica e leishmaniose cutânea (LC) zoonótica e antroponótica. Na vertente zoonótica as infecções ocorrem como zoonoses de animais silváticos ou domésticos e o Homem é apenas infectado accidentalmente, quando exposto ao ciclo natural de transmissão. Nas entidades antroponóticas o Homem é considerado como a única fonte de infecção do flebótomo vector, enquanto nos ciclos de transmissão zoonótica, os animais são os reservatórios que mantêm e disseminam o parasita (Desjeux, 2001).

Os reservatórios de LV causada por *L. infantum* são, na sua maioria, canídeos (cães e raposas). A doença no cão tem uma evolução crónica que favorece a transmissão ao Homem (Abranches *et al.*, 1998).

No cão, o parasita foi identificado pela primeira vez na Tunísia, em 1908, por Charles Nicolle e Comte. Desde então, várias referências têm sido feitas à doença nesta espécie, que constitui o principal reservatório do protozoário no ciclo doméstico (Campino, 1998; Ravel *et al.*, 2006). Nos países da Bacia Mediterrânica, da Ásia e da América Latina, os cães são reservatório da infecção por *L. infantum* /*L. chagasi* (sinónimo de *L. infantum*) (Dantas-Torres, 2007) (Quadro I).

Diversos hospedeiros accidentais têm sido descritos tais como: o cavalo (Koehler *et al.*, 2002, Rolão *et al.*, 2005), o urso (Garnham, 1965) e o lobo (Rebelo, 1993).



O primeiro caso de leishmaniose felina (LF) data de 1912 (Sergent, 1912), sendo o gato considerado, nos últimos anos, por alguns autores, um hospedeiro secundário de *L. infantum*, (Maroli *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007). Todavia, vários casos descritos, de LF na América Latina, Bacia Mediterrânea e Ásia sugerem a hipótese de o gato desempenhar um papel de reservatório habitual (Maia, 2008; Maia *et al.*, 2008; 2010).

A maior parte dos reservatórios estão bem adaptados ao parasita *Leishmania* e desenvolvem infecções ligeiras, que podem persistir durante vários anos, com excepção do cão que normalmente desenvolve a doença de forma generalizada, crónica e fatal.

No Novo Mundo, os roedores, marsupiais e desdentados, são reservatórios selvagens de LC zoonótica (Quadro I).

Os humanos são, no Velho Mundo, reservatórios da LC e LV causadas por *L. donovani* e *L. tropica* respectivamente (Quadro I).

Quadro I – *Leishmania* spp. Patologia, vectores, distribuição geográfica, reservatórios e tipo de transmissão das leishmanioses (Killick-Kendrick, 1999; Sádlová, 1999; Ashford, 2000; Bates, 2007).

	<b>Patologia habitual</b>				
<b>Espécie</b>	Patologia rara	<b>Distribuição geográfica</b>	<b>Vectores</b>	<b>Reservatórios</b>	<b>Transmissão</b>
<i>Leishmania major</i>	<b>LCL; LCD*</b>	Norte, Este e Oeste de África; Próximo e Médio Oriente; Ásia Central; Índia	<i>P. papatasi</i> <i>P. duboscqi</i> <i>P. salehi</i> <i>P. alexandri</i> <i>P. ansarii</i> <i>P. caucasius</i>	Roedores	Zoonótica Rural
<i>Leishmania tropica</i>	<b>LCL; LV</b>	Médio Oriente; Paquistão; Índia; Norte de África; Quênia; Região Mediterrânea	<i>P. sergenti</i> <i>P. guggisbergi</i> <i>P. aculeatus</i>	Homem Canídeos (?) Hiraxes (?)	Antroponótica Urbana
<i>Leishmania aethiopica</i>	<b>LCL; LCD</b>	Etiópia; Quênia	<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>	Hiraxes	Zoonótica Rural
<i>Leishmania donovani</i>	<b>LV</b> <b>LCL</b> <b>LMC</b>	Índia; Nepal; Bangladesh; Paquistão; China; Quênia; Etiópia; Sudão	<i>P. argentipes</i> <i>P. orientalis</i> <i>P. martini</i> <i>P. celiae</i> <i>P. alexandri</i> <i>P. caucasius</i>	Homem Roedores (?) Canídeos (?)	Antroponótica
<i>Leishmania infantum</i>	<b>LV</b> <b>LCL</b> <b>LCD*</b> <b>LMC*</b>	Região Mediterrânea; Balcãs; Médio Oriente; Ásia Central; China; África Oriental	<i>P. permiciosus</i> <i>P. ariasi</i> <i>P. tobii</i> <i>P. neglectus</i> <i>P. perfliewi</i> <i>P. kandelakii</i> <i>P. langeroni</i> <i>P. longicuspis</i> <i>P. smirnovi</i> <i>P. transcaasicus</i> <i>P. chinensis</i> <i>P. longiductus</i>	Canídeos	Zoonótica Peridoméstica
<i>Leishmania chagasi</i>	<b>LV</b> <b>LCL; LCD</b>	América Central e do Sul	<i>L. longipalpis</i> <i>L. evansi</i>	Canídeos	Zoonótica Peridoméstica
<i>Leishmania mexicana</i>	<b>LCL</b> <b>LCD</b> <b>LV*</b>	América Central e do Sul	<i>L. olmeca olmeca</i> <i>L. ayacuchensis</i> <i>L. ylephiletor</i> <i>L. anthophora</i>	Roedores Canídeos	Zoonótica Silvática
<i>Leishmania amazonensis</i>	<b>LCL; LDC</b> <b>MCL</b> <b>VL*</b>	América do Sul	<i>L. flaviscutellata</i> <i>L. olmeca nociva</i> <i>L. reducta</i>	Roedores Marsupiais	Zoonótica Silvática
<i>Leishmania venezuelensis</i>	<b>LCL; LDL</b>	Venezuela e República Dominicana	<i>L. olmeca bicolor</i>	Gatos (?)	Zoonótica (?)
<i>Leishmania peruviana</i>	<b>LCL</b>	Perú	<i>L. peruensis</i> <i>L. verrucarum</i> <i>L. aracuchensis</i>	Canídeos (?) Homem (?)	Zoonótica
<i>Leishmania panamensis</i>	<b>LCL</b> <b>LCD*</b> <b>LMC*</b>	América Central e do Sul	<i>L. trapidoi</i> <i>L. gomezi</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. ylephiletor</i>	Preguiças Roedores Marsupiais Canídeos	Zoonótica Silvática
<i>Leishmania guyanensis</i>	<b>LCL</b> <b>LMC*</b>	América do Sul	<i>L. umbratilis</i> <i>L. whitmani</i> <i>L. anduzei</i>	Preguiças Roedores Marsupiais	Zoonótica Silvática
<i>Leishmania lainsoni</i>	<b>LCL</b>	Brasil e Perú	<i>L. ubiquitalis</i>	Roedores	Zoonótica
<i>Leishmania naiffi</i>	<b>LCL</b>	Brasil Guiana Francesa	<i>L. squamiventris</i> <i>L. paraensis</i>	Desdentados	Zoonótica Silvática
<i>Leishmania shawi</i>	<b>LCL</b>	Brasil	<i>L. whitmani</i>	Primatas; Preguiças	Zoonótica
<i>Leishmania braziliensis</i>	<b>LCL</b> <b>LMC</b> <b>LCD</b> <b>LV*</b>	América do Sul	<i>L. wellcomei</i> <i>L. complexus</i> <i>L. carrerai</i> <i>L. whitmani</i> <i>L. ovallesi</i>	Roedores Canídeos Equinos	Zoonótica Silvática

P. - *Phlebotomus*; L. - *Lutzomyia*; LV - Leishmaniose visceral; LCL - Leishmaniose cutânea localizada; LCD - Leishmaniose cutânea disseminada; LMC - Leishmaniose mucocutânea; \* em estadios de imunodepressão

### 1.4. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. nos hospedeiros

Como já foi anteriormente referido, o ciclo biológico de *Leishmania* spp. envolve populações de hospedeiros vertebrados e invertebrados (Figura 4).

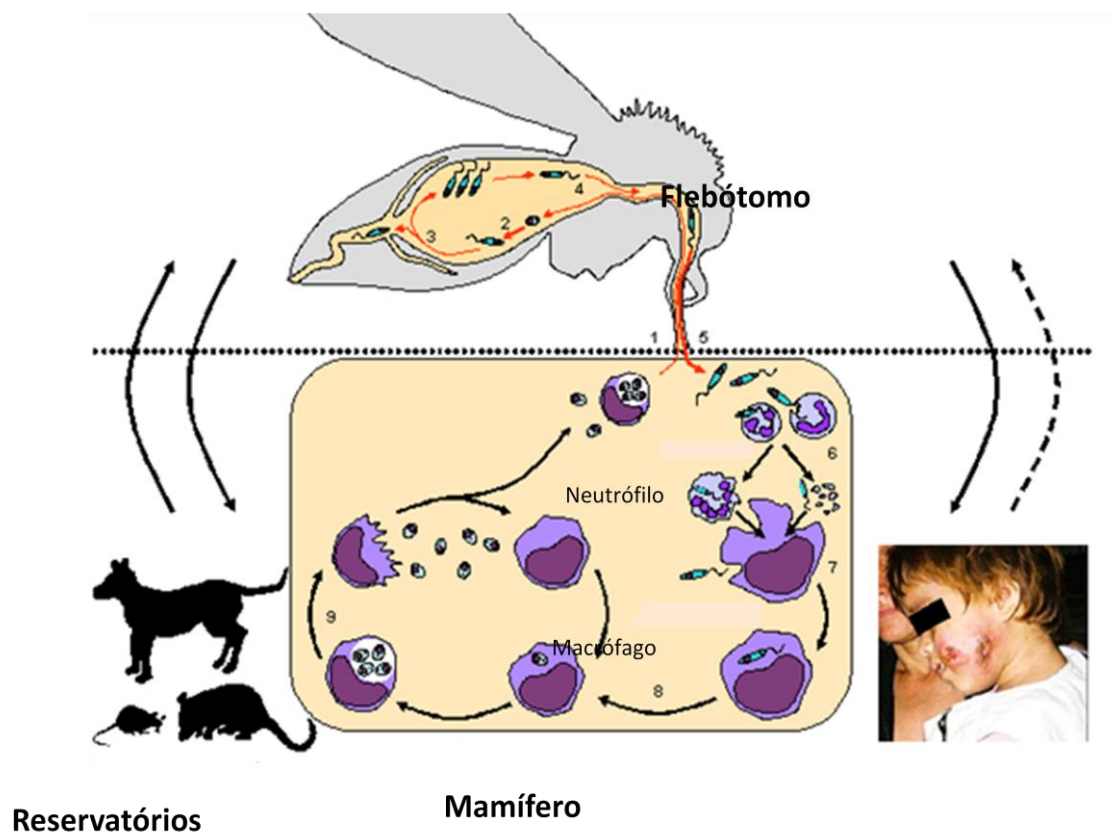


Figura 4 – Esquema do ciclo biológico de *Leishmania*

1. O flebótomo ingere amastigotas durante a refeição sanguínea. 2. Os amastigotas transformam-se em promastigotas. 3. Promastigotas multiplicam-se e colonizam o estômago abdominal ou torácico do flebótomo. 4. Os promastigotas metacíclicos infectantes migram para a região anterior do estômago. 5. Os promastigotas infectantes são transmitidos aos mamíferos através da picada do flebótomo. 6. Os promastigotas invadem os neutrófilos do hospedeiro. 7. Os macrófagos são infectados pelos promastigotas. 8. Os promastigotas transformam-se em amastigotas. 9. Os amastigotas multiplicam-se por divisão binária nas células infectadas.

(Adaptado de: Kato *et al.*, 2010)

### 1.4.1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado

No hospedeiro vertebrado o ciclo biológico é relativamente simples e idêntico em todas as espécies de *Leishmania*. O insecto vector durante a refeição sanguínea inocula promastigotas metacíclicos (formas infectantes) na pele do hospedeiro (Killick-Kendrick, 1990).

Assim, quando um flebotomíneo fêmea, infectado e infectante com *Leishmania*, efectua uma refeição hematófaga num hospedeiro vertebrado, susceptível ao parasita, dá-se a transformação do parasita em formas amastigotas. A invasão do hospedeiro vertebrado por *Leishmania* envolve todas as componentes de defesa do sistema imunitário humoral e celular. Sendo o parasita obrigatoriamente intracelular, o seu primeiro alvo é o macrófago. Apesar de os macrófagos serem células especializadas na fagocitose e destruição de agentes patogénicos, as leishmanias possuem uma série de estratégias que permitem contrariar a actividade dos macrófagos e resistir ao sistema defensivo do hospedeiro. O estabelecimento do parasita processa-se em três etapas principais: (1) reconhecimento e entrada no macrófago, resistindo às componentes citotóxicas do soro; (2) sobrevivência e multiplicação dentro dos macrófagos; (3) modulação da resposta imune mediada pelos linfócitos T (Bogdan *et al.*, 1990). Os promastigotas capturados transformam-se em amastigotas 12-24 horas após a inoculação (Handaman & Bullen, 2002). Após a transformação, os amastigotas multiplicam-se provocando o rebentamento dos macrófagos, sendo consequentemente libertados e fagocitados por novas células. Este estado é crónico na natureza e pode continuar durante meses a anos sem manifestação de sinais ou sintomas, dependendo da susceptibilidade e do estado imunitário do hospedeiro vertebrado. Os macrófagos infectados podem permanecer na pele causando LC levando à formação de lesões na pele, podem invadir células do sistema mononuclear fagocítico causando LV, ou disseminar para as mucosas causando LMC.

### 1.4.2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp no hospedeiro vector

O desenvolvimento intravectorial do parasita é bastante complexo (Walters *et al.*, 1993) (Figura 5). No vector, o desenvolvimento do parasita ocorre no aparelho digestivo. As espécies de *Leishmania* do subgénero *Leishmania* têm um desenvolvimento suprapilárico, ou seja no estômago do flebótomo, enquanto as espécies do Novo Mundo, subgénero *Viannia*, são parasitas peripiláricos, ou seja, os parasitas penetram no intestino posterior antes de migrarem novamente para o estômago (Laison & Shaw, 1987).

Estes dípteros apresentam uma estrutura designada por cárdia, que divide o intestino anterior e o intestino médio, e que consiste numa válvula estomodeal (Romoser, 1996). A referida válvula, tem um papel essencial na alimentação e na capacidade infectante destes vectores e em condições normais assegura o fluxo sanguíneo “num só sentido”, evitando a sua regurgitação. Os parasitas, ingeridos juntamente com o sangue, passam directamente para o segmento abdominal do estômago, onde são envolvidos pela membrana peritrófica. Esta membrana é constituída por quitina e glicoproteínas sintetizadas pelas células epiteliais do tubo digestivo do flebótomo, em resposta ao estímulo sanguíneo, protege o epitélio do estômago do conteúdo da refeição sanguínea e actua como uma barreira que regula a difusão de enzimas digestivas segregadas pelas células epiteliais (Pimenta *et al.*, 1997), encontrando-se completamente formada ao fim de 24 horas após a ingestão sanguínea (Blackburn *et al.*, 1988; Walters *et al.*, 1993; Secundino *et al.*, 2005). A digestão da refeição sanguínea fica completa em quatro a cinco dias.

No vector, os amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicos, caracterizados por fraca mobilidade e multiplicação activa. A transformação de amastigotas em promastigotas inicia-se algumas horas após a ingestão e fica concluída entre 24 a 48 horas (Sharma & Singh, 2008). Ao fim de 48 a 72 horas, os parasitas começam a abrandar a multiplicação e diferenciam-se em formas nectomonas alongadas e com elevado grau de mobilidade. A membrana peritrófica começa então a desintegrar-se, por acção de quitinases segregadas pelo vector e pelo parasita (Schlein *et al.*, 1991; Schlein, 1993; Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005).

Os promastigotas são libertados para o estômago abdominal, no caso dos flebótomos vectores do subgénero *Viannia*, ou para o estômago torácico, no caso dos flebótomos vectores do subgénero *Leishmania*. A capacidade das nectomonas persistirem após a digestão da refeição sanguínea e de se fixarem através do flagelo ao epitélio gástrico, evitando deste modo a sua expulsão durante a diurese, é determinante na classificação de uma espécie flebotomínica como vectora (Bates, 2007). Assim, a capacidade de ligação é uma importante propriedade dos promastigotas de *Leishmania* (Sacks & Kamhawi, 2001).

O principal constituinte da superfície do parasita, o lipofosfoglicano glicoconjugado (LPG) é responsável pela ligação do parasita à galactina no epitélio intestinal em certas espécies como por exemplo *Leishmania major* em *Phlebotomus papatasi* (Pimenta *et al.* 1992; Kamhawi, 2006). No entanto, existem outras moléculas que não o LPG que medeiam a ligação noutras espécies de *Leishmania* (Rogers *et al.*, 2004; Mysková *et al.*, 2007; Volf & Mysková, 2007). Após ligação ao epitélio intestinal, inicia-se uma fase de multiplicação activa dos parasitas que prosseguem a sua migração em direcção ao segmento anterior do estômago.

Ao fim de 5-6 dias após a ingestão, a refeição sanguínea encontra-se completamente digerida e as nectomonas atingem a válvula estomodeal, diferenciando-se em leptomonas que são formas curtas que sofrem multiplicação (Gossage *et al.*, 2003). Estas formas são responsáveis pela secreção de gel secretório promastigota (PSG), uma glicoproteína filamentosa que forma uma matriz gelatinosa que tem um papel importante na transmissão (Rogers *et al.*, 2002). Algumas das nectomonas/leptomonas ligam-se à superfície da válvula e diferenciam-se em haptomonas (Killick-Kendrick *et al.*, 1974). Por fim, algumas leptomonas diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas (Rogers *et al.*, 2002) que correspondem às formas infectantes para os hospedeiros vertebrados.

Pensa-se que o PSG juntamente com as haptomonas, formam um gel viscoso, que uma vez depositado no cárdia, contribui para o bloqueio da válvula estomodeal (Lawyer *et al.*, 1987, 1990; Lang *et al.*, 1991; Rogers *et al.*, 2002) dificultando a entrada de sangue durante a refeição sanguínea. Este bloqueio limita o fluxo da refeição sanguínea e causa um refluxo do sangue. Este, juntamente com a saliva do insecto, transporta formas infectantes de *Leishmania*, e provavelmente como consequência, os vectores infectantes picam a pele mais frequentemente e demoram mais tempo a alimentar-se (Chung *et al.*, 1951; Beach *et al.*, 1985).

Quando se realiza uma segunda refeição sanguínea, as fêmeas dos flebótomos infectadas, e infectantes, por *Leishmania*, têm dificuldade em permitir a passagem do sangue para o intestino médio (Molyneux & Jefferies, 1986; Volf *et al.*, 2004). O insecto é, então, obrigado a realizar várias picadas, facilitando a expulsão das formas metacíclicas infectantes (Killick-Kendrick & Ward, 1981; Killick-Kendrick, 1990; Killick-Kendrick *et al.*, 1997). Estas são depositadas na pele de um hospedeiro vertebrado, levando à transmissão dos parasitas.

O ciclo do parasita no vector tem uma duração de 4 a 17 dias, após a refeição sanguínea da fêmea, dependendo da espécie de *Leishmania* e das condições ambientais (Molyneux & Killick-Kendrick, 1987).

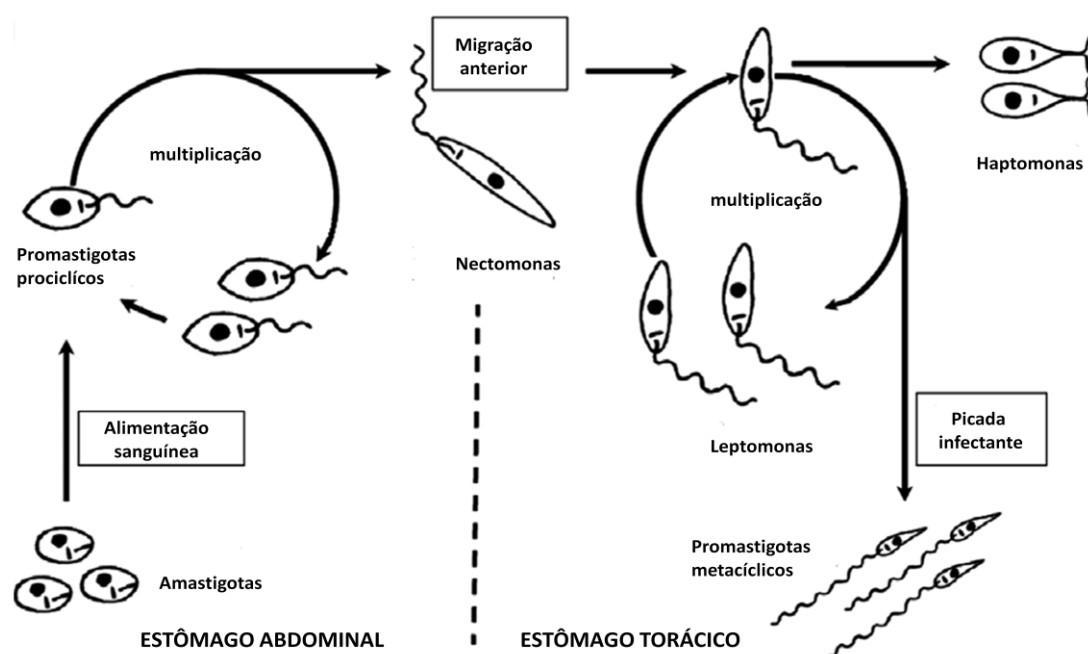


Figura 5 – Desenvolvimento intravectorial de *Leishmania*. Principais formas parasitárias: promastigota procíclicos, neptomonas, leptomonas, haptomonas e promastigotas metacíclicos.

(Adaptado de: Bates, 2007)

Alguns estudos demonstraram que a transmissão do parasita pode processar-se sem interferência do insecto vector. Estão descritos casos de LV: congénita (Eltoum *et al.*, 1992; Sharma & Bahl, 1996), mais raramente, por transfusão de sangue ou de órgãos, devido à partilha de seringas por toxicodependentes (Campino *et al.*, 1994) e por transmissão sexual (Symmers, 1960).

Com o aparecimento da co-infecção *Leishmania*/Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o tipo de transmissão clássico zoonótico, pode passar para antroponótico artificial (através da troca de seringas infectadas), com o aumento da incidência de SIDA (Molina *et al.*, 1999).

## 1.5. Epidemiologia das leishmanioses

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses afectam cerca de 350 milhões de indivíduos em todo o Mundo, com uma incidência anual estimada de 1,6 milhões dos quais 0,5 milhões são devidos a LV e 1,1 milhão a LC. A mortalidade anual é de cerca de 50000 casos.

Estas doenças parasitárias afectam populações de regiões tropicais, subtropicais e temperadas de quatro Continentes: Europa, Ásia, África e América, apresentando um carácter focalizado, sendo endémicas em 88 países (WHO, 2010), em ambientes que vão desde florestas, nas Américas, ao deserto, na Ásia, e de áreas rurais a urbanas (Herwaldt, 1999). Dos 88 países endémicos, 22 são do Novo Mundo e 66 do Velho Mundo (Desjeux, 1996). O maior factor que determina o tropismo e a patologia da infecção por *Leishmania* é a espécie deste parasita (Herwaldt, 1999; Murray *et al.*, 2005).

As leishmanioses são parasitoses em propagação devido a vários factores de risco. Para além das alterações climáticas, as alterações ambientais produzidas pelo Homem (desflorestação, urbanização), assim como o movimento de populações susceptíveis para áreas endémicas ou infectadas para áreas não imunes, podem levar a alterações da densidade vectorial e de reservatórios, podendo conduzir a uma maior exposição a flebótomos infectantes.

As alterações climáticas podem alterar a distribuição da leishmaniose directamente através do efeito da temperatura no desenvolvimento do parasita no insecto vector (Bates, 2007) ou indirectamente, através do efeito de variações ambientais que alteram a densidade sazonal das espécies vectoras (Ready, 2008). Pequenas mudanças na temperatura podem ter um grande efeito na competência vectorial, porque a temperatura afecta a actividade do flebótomo e, portanto, a frequência das refeições sanguíneas. Uma vez que a transmissão ocorre apenas durante a segunda ou subsequentes refeições sanguíneas, o aumento do número destas refeições pode aumentar a probabilidade de transmissão.

A infecção humana por *Leishmania* está dependente da relação ecológica entre a actividade humana, os sistemas de reservatórios e vectores. Qualquer alteração nos factores ambientais é provável que leve a alterações na distribuição do parasita (Ashford, 2000). A desflorestação e a urbanização, com a consequente aproximação de vários vectores e reservatórios a áreas naturais e rurais, poderão também afectar a distribuição mundial das leishmanioses (Desjeux, 2001). A maioria dos países da Região do Mediterrâneo apresenta, pelo menos, uma espécie vectora próxima de áreas rurais ou peri-urbanas (Martinez *et al.*, 2007).

Devido a alterações na susceptibilidade à infecção do hospedeiro humano, como nos casos de imunossupressão, o aparecimento de leishmaniose em regiões urbanas tornou-se mais comum em conjugação com HIV/SIDA, contribuindo para o aumento do problema da coinfeção.



## 1.6. Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas das leishmanioses dependem de interações complexas entre as características de virulência do parasita e da resposta imune do hospedeiro humano. De um modo geral, dependendo do grau de invasão do hospedeiro, as espécies de *Leishmania* podem dividir-se em dermatrópicas e viscerotrópicas.

### 1.6.1. Leishmaniose visceral

Embora todas as formas possam levar a consequências graves, a LV, também conhecida como kala-azar, é a forma mais severa e se não for tratada tem uma mortalidade de quase 100%. Na LV, o parasita invade particularmente o baço, o fígado, a medula óssea e os gânglios linfáticos. Os sintomas clínicos incluem picos febris, perda de peso e astenia. A hepatoesplenomegalia, anemia e hiperproteinémia também estão presentes nos doentes (Brycesson, 1996) (Figura 6).



Figura 6 – Criança com leishmaniose visceral.

(Adaptado de: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leish-2007.htm>)

*Leishmania* é o segundo parasita que causa maior número de mortes mundialmente. A LV afecta principalmente as comunidades mais pobres em zonas rurais, do subcontinente Indiano (Bangladesh, Índia e Nepal), da África Oriental (Etiópia e Quênia) e da América Latina (Brasil). Dos casos anuais, 60% ocorrem em 109 distritos do Bangladesh, Índia e Nepal, onde 150 milhões de pessoas estão em risco de desenvolver LV (WHO, 2010). As principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LV pertencem ao complexo *L. donovani* (Schönian *et al.*, 2010).

*L. donovani* Laveran & Mesnil, 1903 apresenta transmissão antroponótica e é responsável pela LV, na Índia, em algumas regiões da China e em diferentes países do Continente Africano, como o Sudão, a Somália e a Etiópia (Figura 7).

*Leishmania infantum* Nicolle, 1908 é o agente etiológico da LV zoonótica na China e Ásia Central, África Oriental, Médio Oriente, Sul da Europa, Norte de África (países da Bacia Mediterrânica), e na América do Sul, sendo uma infecção emergente em cães na América do Norte (Rosypal *et al.*, 2003; Duprey *et al.*, 2006). No Continente Americano, o agente responsável pela LV é *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. Contudo, estudos de genética evolutiva indicam que aquela espécie é indistinta de *L. infantum*, admitindo-se a hipótese de o parasita ter sido introduzido na América, durante a colonização, através de cães infectados (Dedet, 1993; Maurício *et al.*, 2000). *L. infantum* atinge preferencialmente crianças até aos cinco anos de idade, enquanto *L. donovani* pode infectar adultos de qualquer idade.

Na maioria dos focos clássicos, a LV manifesta-se de forma endémica. Por vezes, a infecção por *L. donovani* pode resultar em graves epidemias com uma taxa de mortalidade elevada. No Sudão têm-se verificado graves surtos desde o início da década de 90 (Ashford *et al.*, 1992), onde cerca de 100 mil indivíduos morreram (WHO, 2000a). Em alguns países da Bacia Mediterrânica (Espanha, França, Itália e Portugal), apesar de não se verificarem epidemias, o aparecimento de novos factores imunossupressores, dos quais a infecção pelo HIV é o mais importante, contribuiu para o aumento do número de casos de infecção por *L. infantum*, principalmente em adultos (WHO, 1995; Desjeux, 1996). No entanto, no final da década de 90, observou-se uma clara diminuição da incidência da coinfeção HIV/*Leishmania*, que pode ser atribuída ao uso generalizado da “highly active antiretroviral therapy” (HAART), desde 1997, na maior parte dos países do Sul da Europa, com a excepção de Portugal, no qual se desconhecem os motivos de não se observar diminuição dos casos de coinfeção (Alvar *et al.*, 2008).

Nos casos de LV, em situações de imunodepressão, as manifestações clínicas atípicas são frequentes, com o envolvimento de tecidos e órgãos que não são usualmente afectados, tais como a pele, sangue periférico e aparelho digestivo. Adicionalmente, indivíduos infectados pelo HIV e crianças imunocompetentes mas, provavelmente, com uma maior susceptibilidade genética, podem desenvolver doença visceral mesmo que infectados por estirpes dermatrópicas (Campino *et al.*, 1994; Benikhlef *et al.*, 2001).

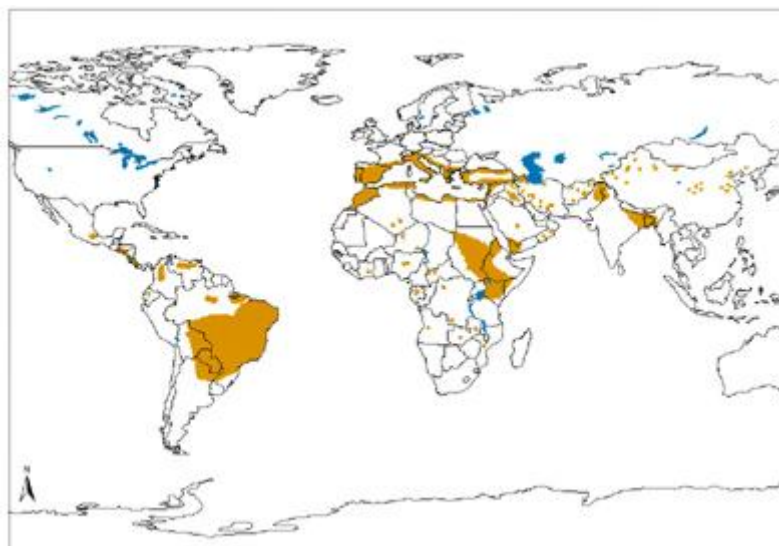


Figura 7 – Distribuição geográfica da leishmaniose visceral.

(Adaptado de: World Health Organization, 2010)

### 1.6.2. Leishmaniose cutânea

A LC é provocada por várias espécies que originam formas clínicas diversas, desde lesões benignas (simples ou múltiplas) a lesões difusas (de difícil cura ou mesmo incuráveis) (Campino & Abranches, 2002). As diferenças nas formas clínicas advêm da espécie parasitária e da informação genética do hospedeiro responsável pela resposta imunológica do indivíduo infectado (Campino, 1998).

As principais espécies responsáveis pela LC no Novo Mundo são *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. panamensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi* e *L. shawi*. No Velho Mundo, as principais espécies responsáveis pela LC são *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*.

A LC típica é caracterizada pela existência de um nódulo local provavelmente provocado pela picada do insecto vector, que ulcera e cura espontaneamente, originando cicatrizes indeléveis e despigmentação da pele (Figura 8). No entanto, em situações de epidemia, a doença tende a ser mais grave, com lesões múltiplas que podem provocar cicatrizes desfigurantes (Desjeux, 1996). O período de incubação varia entre uma a duas semanas até vários meses ou mesmo anos (Bogtish & Cheng, 1998).



Figura 8 – Leishmaniose

(Adaptado de: <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/blood-proto.htm>)

A forma cutânea da leishmaniose pode ser uma zoonose ou uma antroponose dependendo da espécie causadora. *L. major* é uma espécie de transmissão zoonótica e é responsável pela referida forma da doença em países no Norte de África, Médio Oriente e Península Arábica (Quadro I e Figura 9). *L. major* usualmente afecta os membros e as lesões nos lábios ou no nariz não invadem as mucosas.

*L. tropica* é a principal causa de LC no Velho Mundo, distribuindo-se pelo Médio Oriente, Índia e Norte de África (Figura 10; Quadro I), onde provoca infecção de carácter maioritariamente antroponótico (Ashford, 2000). No entanto, em Israel, na Jordânia e na Palestina, a LC causada por *L. tropica* aparenta ser uma infecção zoonótica tendo como principal reservatório os hiraxes (Jacobson *et al.*, 2003; Talmi-Frank *et al.*, 2010a). Recentemente foram reportados casos, em Israel, de infecção por *L. tropica* em chacais e raposas, cujas sequências moleculares do parasita demonstraram estar relacionadas com a sequência dos parasitas isolados nos hiraxes em Israel central. A descoberta de *L. tropica* em animais selvagens assintomáticos implica que espécies de canídeos selvagens possam ser seus hospedeiros naturais (Talmi-Frank *et al.*, 2010 b).

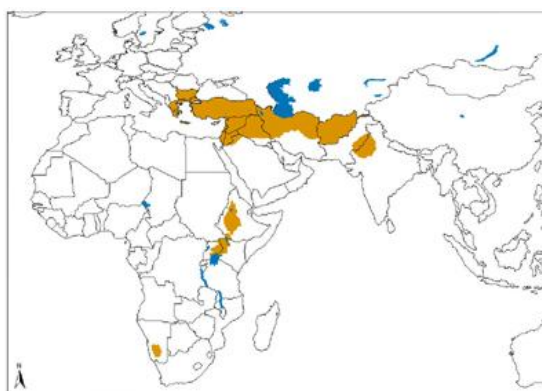


Figura 9 – Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no Velho Mundo provocada por *L. major*.

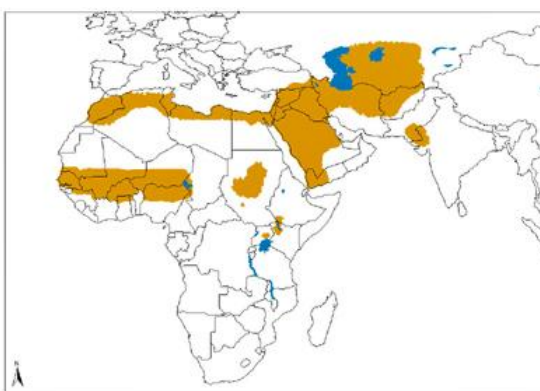


Figura 10 – Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no Velho Mundo provocada por *L. tropica*.

(Adaptado de: World Health Organization, 2010)

A LC difusa é uma forma rara e de cura difícil. Pode ser encontrada em doentes infectados com *L. amazonensis* e, mais raramente, *L. aethiopica*, sendo caracterizada por uma não ulceração das lesões iniciais, mas que após um período de meses ou anos, dissemina-se através da corrente sanguínea para outros locais da pele, principalmente membros e face, produzindo nódulos isolados que contêm no seu interior macrófagos infectados. Estes podem confluir formando placas que podem causar lesões deformantes. Esta forma de doença progride ao longo de muitos anos sendo rara a cura espontânea.

### 1.6.3. Leishmaniose mucocutânea

Clinicamente, a LMC evolui em dois estados sucessivos. O primeiro, muito semelhante à fase cutânea localizada, é caracterizado por um nódulo local que ulcera e cura espontaneamente. O segundo, é caracterizado por apresentar uma imunidade celular exacerbada e causar lesões graves como a destruição total ou parcial das mucosas membranares das cavidades oronasais e faríngeas por metastização secundária, provocando lesões mais agressivas (Dedet & Pratlong, 2003) (Figura 11).

Esta forma clínica, também denominada “Espúndia”, existe na América Central e do Sul. A espécie responsável pela infecção é *L. braziliensis* (Dedet & Pratlong, 2003), podendo estar também associada, mas em menor número, à espécie *L. guyanensis* (Dedet, 1994; Desjeux, 2004).



Figura 11 – Leishmaniose mucocutânea.

(Adaptado de: <http://www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2003/Leishmania/leish%20web.html>)

## 1.7. Leishmanioses na Europa

Na Bacia do Mediterrâneo foram identificadas, três espécies de *Leishmania*: *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica*.

A infecção causada por *L. infantum* é uma zoonose responsável pela maioria dos casos de LV humana sendo os cães o seu principal reservatório. Está distribuída por toda a área do Mediterrâneo sendo endémica em todos os países do Sul da Europa (Gradoni *et al.*, 1984; Pratlong *et al.*, 2004). É um grave problema de saúde pública e veterinária, com aproximadamente 700 casos reportados por ano, em humanos, e uma elevada incidência canina com cerca de 2,5 milhões de cães infectados em Portugal, Espanha, França e Itália (Baneth & Aroch, 2008; Dujardin *et al.*, 2008).

Embora não seja evidente que exista uma relação directa entre a prevalência da leishmaniose canina (LCan) causada por *L. infantum* e a leishmaniose humana, a presença de cães infectados desempenha um importante papel na manutenção da endemia da LV humana. No entanto, a infecção no cão apresenta valores de incidência e prevalência muito superiores e abrange uma área mais vasta quando comparada com a infecção humana (Abranches *et al.*, 1987; Bettini & Gradoni, 1986; Semião-Santos *et al.*, 1995). A incidência de leishmaniose em humanos é relativamente baixa, variando de 0,02/100000 habitantes a 0,49/100000, sendo o ser humano considerado hospedeiro acidental (Dujardin *et al.*, 2008).

Estudos epidemiológicos efectuados em focos de LCan na Europa, revelaram que cerca de metade dos cães parasitados não apresentavam sintomatologia, mas revelavam anticorpos anti-*Leishmania* (Gradoni *et al.*, 1980; Solano-Gallego *et al.*, 2001) indicando a existência de animais aparentemente saudáveis mas que são potencialmente infectantes para o vector (Molina *et al.*, 1994).

Os principais vectores de *L. infantum*, pertencem essencialmente ao subgénero *Larroussius* Nitzulescu, 1931 (Killick-Kendrick, 1990). As espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi*, são os vectores mais importantes na parte ocidental da Bacia Mediterrânica, nomeadamente em Portugal (Rioux *et al.*, 1969).

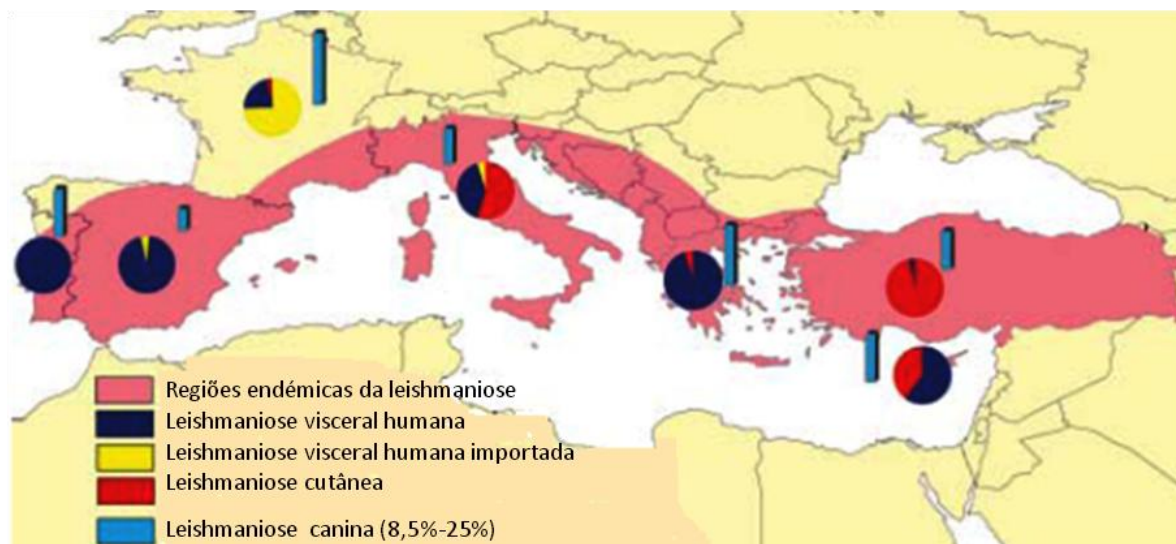


Figura 12 – Leishmanioses na Região Norte da Bacia Mediterrânea. Distribuição das leishmanioses cutânea e visceral humanas autóctone e importada. Leishmaniose canina na Europa.

(Adaptado de: Dujardin *et al.*, 2008)

Provavelmente a incidência de leishmaniose humana não corresponde à realidade por vários motivos: (i) os diagnósticos de pacientes infectados fora do Sul da Europa não são tidos em consideração; (ii) a inexistência de uma rede de vigilância a nível europeu e (iii) a infecção assintomática poder ser comum nalgumas regiões.

Para além da actual realidade da leishmaniose no Sul da Europa, deve-se ter em consideração o risco de introdução de novas espécies de *Leishmania* através de viajantes e de imigrantes infectados e provenientes de países onde essas espécies são endêmicas. Por outro lado, a leishmaniose parece já não estar só limitada aos países da Região do Mediterrâneo, uma vez que foram demonstrados casos de LV humana no Sul da Alemanha (Bogdan *et al.*, 2001).

As viagens colocam em risco a emergência no Sul da Europa da infecção antroponótica por *L. donovani* (Antoniou *et al.*, 2009) e *L. tropica* e a introdução no Norte da Europa de *L. infantum* através de cães importados da Região do Mediterrâneo (Trotz-Williams & Trees, 2003). Essa probabilidade depende do contacto dos humanos infectados com os vectores, da capacidade de indivíduos infectados actuarem como reservatório e da susceptibilidade dos flebótomos existentes neste Continente às diferentes espécies de *Leishmania*.

Deste modo, existem algumas espécies, cujo risco de introdução, estabelecimento e disseminação na Europa, possa ser teoricamente mais elevado, nomeadamente *L. donovani*, que ao ser transmitida



por várias espécies de flebotomíneos, no exterior da Europa, poderá infectar espécies de flebótomos existentes no Continente Europeu (Volf *et al.*, 2007). É de realçar que, recentemente, *L. donovani* foi introduzida no Chipre (Antoniou *et al.*, 2009).

A LC causada por *L. tropica* é esporadicamente endémica na Grécia e nos países vizinhos da União Europeia. O principal vector, *P. sergenti*, está abundantemente distribuído no Sul da Europa, onde poderá originar novos focos, através de humanos infectados no Norte de África e no Médio Oriente (Magill *et al.*, 1993). *L. tropica* foi isolada a partir de cães domésticos e ratos pretos (Desjeux, 2004; Gramiccia & Gradoni, 2007) pelo que o risco de introdução e disseminação de LC causada por este parasita na União Europeia, deve ser reavaliado se qualquer destes mamíferos ou de espécies sinantrópicas forem encontrados como reservatórios em focos de infecção limítrofes do Continente Europeu, tais como, no Norte de África ou Sudoeste Asiático (Parvizi *et al.*, 2008).

Apesar do principal reservatório roedor de LC, causada pelo parasita *L. major*, não existir no Sul da Europa, a emergência da infecção por esta espécie de *Leishmania* não deve ser menosprezada uma vez que o seu principal vector *P. papatasi* é localmente abundante. Por outro lado, a LC causada por parasitas existentes na América, do complexo *L. braziliensis* e *L. mexicana*, apresentam um baixo risco de introdução, a curto e longo prazo, devido à ausência de vectores e mamíferos reservatórios no Sul da Europa (Ready, 2010). No entanto, é necessário ter em conta o potencial risco destes parasitas serem introduzidos na Europa por utilizadores de drogas intravenosas e estabelecerem um local de transmissão devido a troca de seringas, especialmente em doentes HIV co-infectados (Bates, 2007; López-Vélez, 2003).

## **1.8. Leishmanioses em Portugal**

O primeiro caso de leishmaniose visceral em Portugal foi reportado em 1910 numa criança de 9 anos residente em Lisboa (Alvares, 1910). No ano seguinte, Alvares & Silva apresentaram os resultados de um inquérito referentes a 300 cães da Região de Lisboa, dos quais oito apresentavam leishmanias (Alvares & Silva, 1911). A partir de 1951, devido ao aumento da incidência da leishmaniose por todo o país (1616 casos), o kala-azar passou a fazer parte das doenças de notificação obrigatória (Azevedo, 1960).

A aplicação de insecticidas durante as campanhas de erradicação da malária provocou também a diminuição da densidade flebotomínica, originando um decréscimo dos casos de LV, principalmente na Região Sul do país (Azevedo, 1960). A partir de 1970, a incidência da leishmaniose aumentou em várias regiões (Abranches & Pires, 1980). No nosso país, a doença tem



sido considerada predominantemente infantil, mas verifica-se uma tendência para a diminuição do número de casos em crianças e o aumento da infecção em adultos, principalmente associada a casos de HIV (Campino, 1998).

Embora a LV seja a forma clínica mais comum em Portugal, foram diagnosticados vários casos de LC. O primeiro caso de leishmaniose cutânea em Portugal foi descrito em 1943 (Tavares, 1943) num adulto na região do Alto Douro. A maioria dos casos de LC subsequentemente reportados, foram em crianças (Manso *et al.*, 1998). Embora a LC não seja tão frequente em Portugal como em Itália ou Espanha, onde se verificam focos de elevada endemicidade, esta doença deverá deixar de ser encarada como muito rara, estimando-se que sejam diagnosticados anualmente cerca de dez novos casos. Ao contrário da LV, actualmente, a LC não é de notificação obrigatória (Campino & Maia, 2010).

De acordo com as notificações oficiais, nos últimos anos, tem-se observado um decréscimo da doença na população humana portuguesa. Contudo, desde o início de 2000 até ao final de 2009 foram diagnosticados laboratorialmente, na Unidade de Leishmanioses do IHMT, 173 novos casos de LV humana, 66 dos quais em indivíduos imunocompetentes (46 crianças e 20 adultos) e 107 em adultos imunodeprimidos. Na Direcção Geral de Saúde ([www.dgs.pt](http://www.dgs.pt)) entre o início de 2000 e 2009 apenas foi notificado um total de 133 casos (58 crianças e 75 adultos) de LV dos quais 68 pertenciam à Região Metropolitana de Lisboa. Estes números provam a subnotificação da doença, já que, apesar de ser de declaração obrigatória desde os anos 50, os números oficiais dos últimos anos abrangem cerca de uma dezena de casos por ano em todo o país. O número de casos de LCan tem vindo a aumentar no nosso país, estando esta zoonose incluída, desde 2002, no grupo das infecções de notificação obrigatória durante as campanhas de vacinação anti-rábica (Campino & Maia, 2010).

### **1.8.1. Focos de leishmaniose em Portugal**

Embora tenham sido observados, casos de LV e de LCan, em várias regiões de Portugal (Figura 13), até à presente data, têm sido referenciados três focos endémicos devido à co-existência de humanos, cães e flebótomos infectados com *Leishmania*: a Região do Alto Douro (RAD), a Região Metropolitana de Lisboa (RML) que inclui áreas urbanas e rurais (Parque Natural da Arrábida) e a Região do Algarve (RA) (Abranches *et al.*, 1992; Sampaio-Silva *et al.*, 1993; Campino *et al.*, 1995).

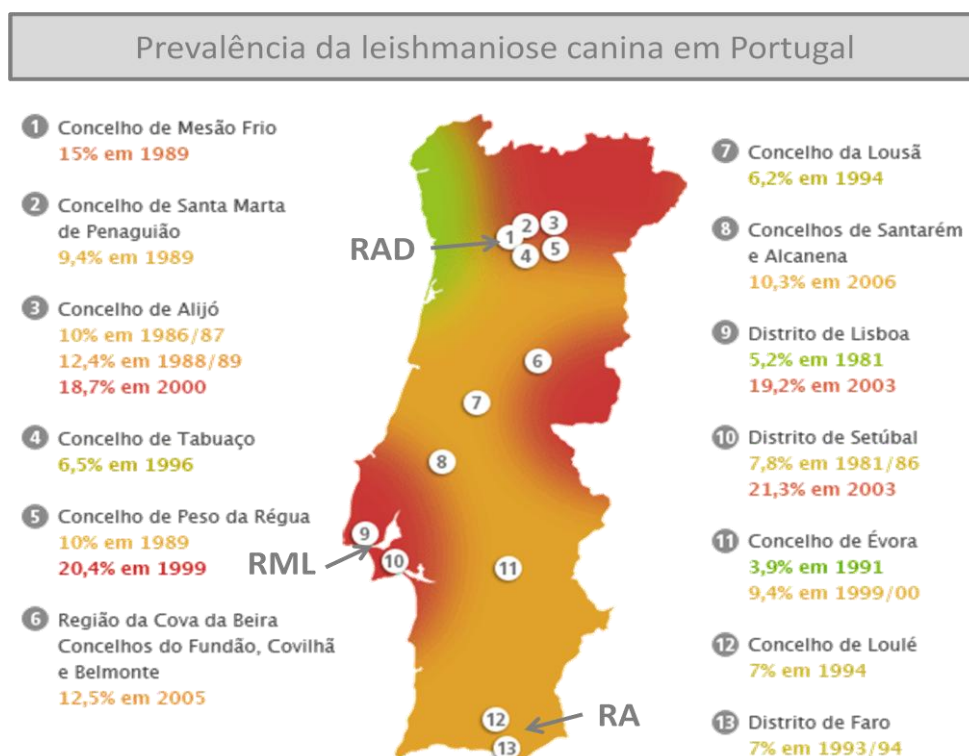


Figura 13 – Prevalência da leishmaniose canina em Portugal, segundo o Observatório Nacional das Leishmanioses.

(Adaptado de: <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>)

#### 1.8.1.1. Região do Alto Douro

A RAD tem-se revelado o foco mais activo da infecção humana e canina. Segundo dados da Direcção Geral de Saúde (DGS), a incidência anual da infecção humana era de 8,3 casos/100 mil habitantes (cálculos efectuados a partir dos dados oficiais publicados pela DGS e CENSOS 1991). Inquéritos epidemiológicos efectuados nesta região, entre 1986 a 1989, revelaram uma prevalência da infecção canina de 10 a 12,4 % (Abranches *et al.*, 1992; Sampaio-Silva *et al.*, 1993). Em 2004, um estudo de seroprevalência, neste mesmo concelho, revelou uma prevalência total de 18,7%, sendo que numa das freguesias os valores chegaram a 81,1% (Cardoso *et al.*, 2004).

#### 1.8.1.2. Região Metropolitana de Lisboa

A RML, onde actualmente existe o maior número de casos humanos de leishmaniose, sobretudo em indivíduos co-infectados com HIV, apresentava uma incidência anual da infecção humana de 0,2 casos/100 mil habitantes (DGS e CENSOS 1991), verificando-se mais casos de infecção nas zonas

urbanas do que nas zonas rurais. Estudos epidemiológicos de leishmaniose realizados nesta região indicaram uma maior prevalência da infecção canina na área rural (8.8 %) do que na área urbana/suburbana (3.8 %) e uma situação inversa na prevalência da infecção humana. O Parque Natural da Serra da Arrábida apresentava o valor mais elevado com cerca de 10,9% de animais infectados (Abranches *et al.*, 1987). Num estudo em raposas (*Vulpes vulpes* Miller, 1907), realizado nesse mesmo local, foram encontrados infectados 5,6 % de um total de 71 animais estudados, justificando a existência de um ciclo silvático semi-autónomo nesta área geográfica (Abranches *et al.*, 1984). Mais recentemente, em 2007, Cortes *et al.*, realizaram um inquérito epidemiológico canino na área urbana da Grande Lisboa obtendo uma prevalência de 19,2%.

Na cidade de Lisboa, Maia *et al.* (2010), efectuaram um estudo da LF e encontraram DNA de *L. infantum* no sangue periférico em 20,3% dos 138 gatos analisados. Demonstraram também que os gatos são susceptíveis ao parasita, uma vez que a maioria eram assintomáticos e sem infecções imunossupressoras.

Recentemente foram isolados em três indivíduos imunodeprimidos, residentes na RML, híbridos *L. infantum/L. major*. Estas duas espécies possuem distribuições geográficas distintas e são transmitidas por vectores de espécies diferentes a diferentes reservatórios mamíferos. Estas ocorrências vêm levantar questões relativamente à frequência dos cruzamentos genéticos entre estirpes em condições naturais e sobre a importância epidemiológica dos seus fenótipos na patogenicidade da infecção e resistência aos fármacos (Ravel *et al.*, 2006).

### **1.8.1.3. Região do Algarve**

No Serviço de Pediatria do Hospital Distrital de Faro, foram diagnosticados 43 casos de LV entre 1980 e o primeiro semestre de 1988, sendo a maioria proveniente do concelho de Loulé (Vicente, 1990). Apesar da incidência da leishmaniose humana ser naquela região e nessa época de 1,2 casos/100000 habitantes/ano (DGS e CENSOS 1991), nos últimos anos não se registou nenhum caso em indivíduos imunocompetentes.

A prevalência da infecção canina encontrada neste concelho do Algarve foi de 7%, constituindo o segundo foco mais importante do país em LCan (Campino *et al.*, 1995). Em 2006, realizou-se um rastreio para determinar a seroprevalência da leishmaniose canina, no qual, se detectaram 28,78% (28/132) de cães com valores significativos de anticorpos anti-*Leishmania* (Maia *et al.*, 2007).

### 1.8.2. Distribuição dos vectores de *Leishmania* em Portugal

Em Portugal são conhecidas quatro espécies do género *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840: *P. (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917, *P. (Phlebotomus) papatasi* Scopoli, 1786, *P. (Larroussius) perniciosus* Newstead, 1911 e *P. (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921. Verifica-se também a existência de uma espécie do género *Sergentomyia* França & Parrot, 1920: *S. (Sergentomyia) minuta* Rondani, 1843 (Pires, 2000).

*P. ariasi* e *P. perniciosus* são comprovadamente vectores de *L. infantum*, nas regiões do RAD e RML (Pires, 2000; Campino *et al.*, 2006). *P. ariasi* apresenta maiores densidades na RAD e *P. perniciosus* na RA. Nesta região, *P. perniciosus* será provavelmente responsável pela transmissão do parasita, uma vez que *P. ariasi* apresenta densidades francamente inferiores e ainda não foi encontrado infectado (Pires *et al.*, 2001). As espécies *P. papatasi* e *P. sergenti* são espécies conhecidas como vectoras de LC (*L. major* e *L. tropica*), mas até à presente data, as suas densidades são inferiores e de menor distribuição em relação a *P. perniciosus*. *P. sergenti* apresenta uma maior expressão a Sul do Tejo (Pires *et al.*, 2001; Afonso *et al.*, 2005). *S. minuta* é pouco frequente na RAD e mais abundante no Algarve (Pires, 2000, Pires *et al.*, 2001).

As preferências hemáticas destes insectos variam dentro da mesma espécie consoante a região onde se encontram: umas populações são mais antropofílicas outras mais zoofílicas. Normalmente, *P. ariasi* é particularmente atraído por cães, raposas, bovinos, equídeos, mustelídeos e leporídeos (Guy *et al.*, 1984). *P. perniciosus* apresenta uma preferência alimentar por cães, gado doméstico (Rioux *et al.*, 1969) e roedores (Gradoni *et al.*, 1983). Na Arrábida, estudos realizados por Pires (1984;1988) demonstraram que, *P. perniciosus* manifesta claramente um carácter endofílico, encontrando-se sobretudo em biótopos domésticos, enquanto *P. ariasi* apresenta um comportamento exofílico dominando os biótopos silváticos.

### 1.9. Identificação da infecção por *Leishmania* nos flebotomíneos fêmeas

A determinação da infecção natural por *Leishmania* spp. em populações de flebotomos é um elemento importante de vigilância, da previsão de risco, da prevalência da doença, e da expansão da leishmaniose em áreas endémicas. Por outro lado, a identificação das espécies de *Leishmania* é importante para melhor se interpretar a epidemiologia das infecções e é crucial para a implementação de medidas de controlo (Schallig & Oskam, 2002).

Existem dois métodos clássicos para a determinação da infecção nos vectores: a observação microscópica dos parasitas e o isolamento em cultura. A observação microscópica de promastigotas em flebótomos dissecados é uma tarefa difícil, necessita de um elevado grau de experiência e é um procedimento demorado (Hashiguchi & Gomez, 1991). Outra desvantagem desta técnica relaciona-se com a imprecisão, por vezes obtida, uma vez que muitas espécies e subespécies de protozoários flagelados são morfologicamente indistinguíveis.

A cultura dos parasitas, após dissecação das fêmeas infectadas, é mais sensível que o exame directo, aumentando assim a probabilidade de sucesso do diagnóstico, embora a obtenção do resultado seja demorada e condicionada pela ausência de contaminação bacteriana ou fúngica das culturas. É também necessário ter em conta que nem todos os isolados crescem em meio de cultura. Porém, o isolamento da estirpe em meio de cultura possibilita: (1) a identificação da estirpe por tipagem isoenzimática ou molecular, dado que as espécies de *Leishmania* são morfologicamente indistinguíveis; (2) a obtenção de um número suficientemente elevado de organismos para inoculações em infecções experimentais e para obtenção de antígenos; (3) estudos *in vitro* da eficiência de fármacos (Maia, 2008).

Os métodos serológicos de determinação da infecção nos vectores baseiam-se na utilização de anticorpos monoclonais específicos para *Leishmania* em ensaios imunoenzimáticos e de imunofluorescência indirecta. Estes ensaios provaram ser úteis para estudos epidemiológicos, devido ao elevado número de amostras que podem ser analisadas ao mesmo tempo. No entanto, devido à baixa sensibilidade e necessidade de dissecação do aparelho digestivo dos flebótomos, também apresentam desvantagens (Adini *et al.*, 1998).

Diversos estudos têm provado que a reacção em cadeia da polimerase (PCR) é considerada uma óptima ferramenta para o diagnóstico de várias doenças infecciosas. Devido à sua elevada sensibilidade, detecta parasitas numa grande variedade de amostras clínicas (Minodier *et al.*, 1997; Schallig & Oskam, 2002). No entanto, a sensibilidade e especificidade desta técnica dependem das sequências iniciadoras, do número de cópias da sequência alvo, do método de extracção de DNA, do produto biológico utilizado e do protocolo de PCR (Alvar *et al.*, 2004; Cortes *et al.*, 2004; Baneth & Aroch, 2008). Esta técnica é cada vez mais utilizada e aceite como método de diagnóstico na identificação de flebótomos fêmeas infectadas por *Leishmania*.

Nos últimos anos foram utilizadas nos ensaios de PCR, várias sequências iniciadoras nucleotídicas, específicas para o DNA de *Leishmania* (Ashford *et al.*, 1995). Para uma maior sensibilidade podem ser utilizadas como alvos moleculares sequências multi-cópia. No caso das leishmanias, essas sequências incluem: os minicírculos do DNA cinetoplastideal (kDNA) (Smyth *et al.*, 1992; Chicharro *et al.*, 2002; Cortes *et al.*, 2004), genes codificantes da pequena subunidade do RNA

ribossômico (ssu rRNA; 20-40 cópias), o “internal transcribed spacer” do operão ribossômico (Van Eys *et al.*, 1992; Schönian *et al.*, 2003), sequências repetitivas do DNA nuclear (Piarroux *et al.*, 1993) e microssatélites (Bulle *et al.*, 2002; Khuls *et al.*, 2005; Ochsenreither *et al.*, 2006).

No presente estudo, foram utilizados como alvo de *Leishmania* o kDNA e a região “Internal transcribed Spacer 1” (ITS-1) do gene do DNA ribossomal. O minicírculo de kDNA tem como vantagens estar presente em cerca de 10000 cópias por célula e de a sequência de minicírculo ser conhecida para a maioria das espécies de *Leishmania*, e esta possuir uma região variável que pode permitir a discriminação entre espécies. A região ITS-1, localiza-se entre os genes 18S e 5.8S e constitui um método sensível e específico para a detecção de DNA de diferentes espécies de *Leishmania* (Schönian *et al.*, 2003).

### **1.10. Identificação das refeições hemáticas de fêmeas flebotomínicas**

A identificação das refeições sanguíneas de insectos hematófagos indica as preferências alimentares em relação aos hospedeiros vertebrados e, indirectamente, pode ainda indicar a existência de potenciais reservatórios (Brandão-Filho *et al.*, 2003).

Em condições naturais, os ciclos de transmissão de *Leishmania* podem envolver um elevado número de espécies de vertebrados. Pensa-se que podem estar envolvidas mais de 62 espécies de mamíferos pertencentes a 46 géneros, 21 famílias e 9 ordens (Dereure, 1999). Devido a esta complexidade, pode ser difícil identificar todos os reservatórios envolvidos (Leger & Depaquit, 1999).

A origem das refeições sanguíneas do insecto vector pode ser identificada por diferentes metodologias que variam consideravelmente na capacidade de identificar as fontes alimentares ao nível de espécies. As fontes das refeições sanguíneas de artrópodes hematófagos eram tradicionalmente identificadas através de métodos serológicos (Washino & Tempelis, 1983). Inicialmente foram usados testes de precipitação e inibição da hemaglutinação (Ogusuku *et al.*, 1994; Boreham, 1975) e posteriormente substituídos pelos testes imunoenzimáticos, baseados em técnicas que requerem anticorpos policlonais contra componentes sanguíneos dos potenciais hospedeiros (Beier *et al.*, 1988; Gomez *et al.*, 1998; Gomes *et al.* 2001; Svobodová *et al.* 2003). Os testes serológicos permitem identificar a fonte da refeição sanguínea ao nível da espécie, no entanto, apresentam como desvantagens, a existência de reacções cruzadas entre espécies, a exigência de produção de anticorpos específicos numa ampla gama de potenciais hospedeiros e a incapacidade de descobrir novos hospedeiros (Chow *et al.*, 1993; Hunter & Bayly, 1991). Outra desvantagem é

que um resultado negativo pode implicar apenas que o flebótomo não se alimentou nas espécies testadas.

Mais recentemente, foram desenvolvidos ensaios com elevado grau de sensibilidade e especificidade baseados em biologia molecular. A técnica de PCR, para a identificação de refeições sanguíneas em artrópodes, providencia uma conveniente alternativa aos métodos imunológicos.

A técnica de PCR baseada no gene do citocromo B mitocondrial (cyt B) é uma importante ferramenta para a identificação de refeições sanguíneas de artrópodes, devido ao elevado número de cópias do gene mitocondrial e à variação genética ao nível da sequência primária que permite identificar com confiança os diferentes taxons de vertebrados (Ngo & Kramer, 2003; Rebekah & Douglas, 2005). O aspecto mais importante deste método é a sensibilidade de detectar pequenas quantidades de DNA do hospedeiro vertebrado nas refeições sanguíneas dos flebótomos. Contudo, a sensibilidade do método depende da quantidade do DNA alvo do hospedeiro. A amplificação do DNA mitocondrial seguida pela purificação e sequenciação dos produtos amplificados na PCR têm sido utilizadas para identificação da fonte da refeição sanguínea de insectos hematófagos (Haouas *et al.* 2007).

A sequenciação directa do gene do cyt B permite a identificação dos hospedeiros a nível de espécie, com um elevado grau de precisão, através do alinhamento das sequências obtidas com as sequências existentes na base de dados do GeneBank (Townzen *et al.*, 2008; Alcaide *et al.*, 2009).

As desvantagens na utilização de métodos de PCR, para a identificação das preferências tróficas dos flebótomos, prendem-se com o facto de: (i) serem insectos de reduzidas dimensões, cujo tamanho varia dentro da mesma espécie e entre espécies, capazes de ingerir diminutas quantidades de sangue que podem variar entre 0,5 a 1 microlitros (Daba *et al.*, 2004), e (ii) poder ocorrer degradação do DNA durante a digestão sanguínea (Rogers *et al.*, 2002).

### **1.11. Medidas de controlo das leishmanioses**

O controlo das leishmanioses é um processo deveras complexo devido à diversidade de vectores, parasitas e reservatórios sendo recomendada a utilização de estratégias integradas (Killick-Kendrick, 1999).

Segundo a OMS, as estratégias de controlo devem incidir sobre: a) os vectores, relativamente às vertentes biológicas, ecológicas e químicas; b) os parasitas, eliminando-os nos hospedeiros vertebrados através do tratamento dos doentes e dos reservatórios sempre que possível; c) a protecção individual e colectiva da população humana e canina. Adicionalmente, o

desenvolvimento de vacinas deve ser encorajado uma vez que a vacinação é uma das medidas de controlo mais promissoras (WHO, 1990; Tesh, 1995; Dye, 1996).

O método mais eficaz para controlar doenças, cujos agentes patogénicos são transmitidos por artrópodes vectores, é reduzir o contacto Homem-vector. A redução da densidade vectorial poderá ser uma estratégia viável no controlo das leishmanioses. Os principais métodos de controlo químico do vector são o uso local/regional de insecticidas e o uso de redes mosquiteiras impregnadas com insecticidas, quando os flebótomos são endofágicos. Os insecticidas utilizados são, entre outros, organocloreto (DDT), organofosfatos (malatião) e carbamatos.

Em regiões onde ocorra transmissão peri-urbana e os vectores sejam acessíveis, os insecticidas residuais (a utilização do DDT, durante as campanhas antimaláricas, levou a uma diminuição considerável na população flebotomínica) podem reduzir com êxito a incidência das leishmanioses humana e canina. No entanto, devido à resistência demonstrada pelos flebótomos em algumas regiões (Kaul *et al.*, 1978; Mukhopadhyay *et al.*, 1996; Kishore *et al.*, 2006), assim como os elevados custos e as implicações do seu uso sobre o meio ambiente e o Homem (Singh *et al.*, 2001; Tetreault *et al.*, 2001), a OMS só recomenda a sua aplicação em casos de epidemias graves (WHO, 1990).

O controlo biológico contra os vectores através da utilização de bactérias como *Bacillus thuringiensis* var. israelensis (de Barjac *et al.*, 1981; Yuval & Warburg, 1989) e *B.s. sphaericus* (Pener & Wilamowski, 1996) fatais para as larvas dos flebótomos, de ácaros (Shehata & Baker, 1996), e de nemátodos parasitas de alguns flebótomos, poderá contribuir para a diminuição da densidade vectorial (Ribeiro *et al.*, 1994; Pires *et al.*, 1997).

A modificação do habitat dos vectores através da substituição do tipo de culturas existentes e da construção de aldeias em que as fontes alimentares e potenciais abrigos estejam reduzidos, poderá contribuir para uma redução na taxa de transmissão da doença a longo prazo (WHO, 1990).

A aplicação individual de repelentes, é uma das estratégias de controlo do parasita, através da protecção do Homem e do cão contra as picadas dos flebótomos. Contudo o tempo de actividade é reduzido e os seus efeitos variam com as espécies de flebótomos testadas (Coleman *et al.*, 1993; Kalyanasundaram *et al.*, 1994).

Outra estratégia é a aplicação de esquemas terapêuticos disponíveis para estas parasitoses. No entanto, estes nem sempre são eficazes, nem de fácil administração e, em determinadas regiões, a resistência aos fármacos de primeira linha são uma realidade (Lira *et al.*, 1999). A leishmaniose no cão é mais resistente à terapia do que no Homem, sendo frequentes as recrudescências após o tratamento, especialmente em animais com infecções sintomáticas (Mancianti *et al.*, 1988; Alvar *et al.*, 1994). O controlo da infecção no cão, sendo este animal um reservatório do parasita, permitiria



também reduzir o risco de infecção da população humana. O abate de cães domésticos sintomáticos já efectuado na China (Zhi-Biao *et al.*, 1984), no Brasil (Nascimento *et al.*, 1996; Dietze *et al.*, 1997; Ashford *et al.*, 1998; Nunes *et al.*, 2008) e em Itália, não foi totalmente eficaz uma vez que os cães assintomáticos, constituem um bom reservatório do parasita e são fonte de infecção dos flebótomos (Killick-Kendrick *et al.*, 1994; Molina *et al.*, 1994; Campino, 1998).

O recolhimento dos animais, antes de escurecer até ao amanhecer, durante a época de transmissão vectorial (Davidson, 1999), assim como a utilização de sprays, coleiras e champôs com insecticidas, nos cães, é uma forma de diminuir a interacção vector/hospedeiro, conduzindo a uma redução na taxa de transmissão da leishmaniose entre animais e humanos (Ascher *et al.*, 1997; Pires *et al.*, 1997; Killick-Kendrick *et al.*, 1997; Maroli *et al.*, 2001; Molina *et al.*, 2001; 2006; Halbig *et al.*, 2000; David *et al.*, 2001; Gavgani *et al.*, 2002; Mencke *et al.*, 2003; Miró *et al.*, 2007).

A vacinação dos cães representa provavelmente a melhor forma de controlar a LV humana (Dye, 1996). Nos últimos anos têm sido desenvolvidas novas estratégias vacinais baseadas em compostos quiméricos obtidos da fusão de fragmentos procedentes de diferentes proteínas antigénicas administrados com bactérias vivas (BCG) como adjuvante assim com o uso de vacinas compostas de DNA plasmídico ou vacina recombinante, capazes de expressar o antígeno LACK de *L. infantum* (Miró *et al.*, 2008). Recentemente, uma vacina enriquecida pelo ligando frutose-manose de *L. donovani* mostrou 92-97% de protecção contra a LCan e foi registada no Brasil para uso veterinário (Borja-Cabrera *et al.*, 2002, 2004; Saraiva *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de redes epidemiológicas nacionais e internacionais, tal como o Observatório Nacional de Leishmanioses ([www.onleish.com](http://www.onleish.com)), fundado recentemente em Portugal, assim como o Leishrisk ([www.leishrisk.org](http://www.leishrisk.org)) que tem como objectivo principal a coordenação de outras redes europeias de leishmaniose, permite a divulgação dos resultados mais relevantes obtidos através das actividades desenvolvidas pelas mesmas e promovem a vigilância e o controlo destas parasitoses a nível mundial.

## II. OBJECTIVOS

### **Os objectivos gerais do presente estudo foram:**

- Actualizar a distribuição, a abundância relativa, a densidade e outros aspectos vectoriais das espécies flebotomínicas na Região do Algarve para uma possível aplicação na vigilância epidemiológica do sistema biológico vectores/*Leishmania* spp./hospedeiros.

### **Os objectivos específicos foram:**

- Determinar a infecção natural dos flebótomos, por *Leishmania*, na Região do Algarve, através de métodos de biologia molecular.
- Determinar as preferências hemáticas de fêmeas flebotomínicas, na Região Algarvia, através de métodos de biologia molecular.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Área de estudo

Este estudo foi realizado, em 2007, na Região do Algarve, que corresponde a um dos focos endémicos de leishmaniose em Portugal e onde a prevalência da infecção por *L. infantum* nos cães é elevada. A RA situa-se no Sul do país e no extremo Sudoeste da Península Ibérica sendo considerado um foco de leishmaniose desde a década de 80 (Século XX).

O Algarve encontra-se a uma latitude de 37° Norte e a uma longitude de 7°25' e 9°00' Oeste, apresenta um comprimento de Norte a Sul entre 30-40 quilómetros (km) e cerca de 130-150 km Este-Oeste e ocupa uma superfície cuja área total é de 4988,5 km<sup>2</sup> (Sistema de Gestão de Nomenclaturas Territoriais, 1997). A altitude média do Algarve é de 150 m; 23% da área total da região situa-se abaixo dos 50 m de altitude e 21% entre 50 m e 100 m. As altitudes entre os 100 m e os 300 m representam 43% e apenas 12% da superfície situa-se acima dos 300 m.

Esta Região está dividida em duas sub-regiões, Sotavento e Barlavento Algarvio, e em 16 concelhos e 84 freguesias. Os limites dos concelhos e freguesias encontram-se definidos na Figura 14.



Figura 14 – Localização geográfica da Região Algarvia.

(Adaptado de: DGA, Atlas do Ambiente, 1995).

O clima da RA caracteriza-se por verões quentes e secos e por precipitação extremamente variável. As estações do ano Outono e Inverno são aquelas em que se registam os maiores valores de precipitação e nos meses de temperatura mais elevada (Verão), a precipitação é quase nula, atingindo o seu mínimo em Julho. Em Janeiro a precipitação é de 75 mm e em Julho desce para 2-0 mm. A temperatura média, em Julho, oscila entre os 22,5 e os 25,0°C, e em Janeiro, observam-se temperaturas mínimas de 12,5°C (Serviço Meteorológico Nacional, 1974).

A vegetação mediterrânica, é representada, fundamentalmente, pelo pinheiro manso (*Pinus pinea*), o sobreiro (*Quercus suber*), a azinheira (*Quercus ilex*), a alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*) e a palmeira anã (*Chamaerops humilis*). A oliveira (*Olea europaea*), a figueira (*Ficus carica*) e a amendoeira (*Amigdalus comunis*) também se encontram amplamente distribuídas na RA (Girão, 1941; Gaspar, 1979).

### **3.2. Captura dos flebótomos**

Realizaram-se saídas de campo, com a duração média de 2-3 dias, entre Março a Novembro de 2007. Foram colocadas armadilhas luminosas miniaturizadas, tipo CDC, para captura dos flebótomos, em 57 localidades de 12 concelhos da RA, abrangendo 32 localidades no Sotavento Algarvio e 25 no Barlavento (Quadro II).

Para caracterização dos biótopos foram recolhidos dados climáticos (temperatura), flora predominante, e tipo de hospedeiros vertebrados existentes que, eventualmente, pudessem consistir na fonte de alimentação sanguínea das potenciais espécies vectoras.

Quadro II - Distribuição das localidades, por concelhos, onde foram colocadas armadilhas para captura de flebótomos na Região Algarvia.

	Concelho/Município	Localidade
Sotavento	Loulé	Quinta da Marroquia, Goncinha, Sobralinho de Alfeição, Loulé, Benafim-Quinta do Freixo, Paula Farrajota
	Faro	Quinta da Galvana, Goldra, Gambelinas, Montenegro, Gambelas, Stº Antº do Alto, Alcaria Cova- Estói, Aeroporto, Universidade
	Olhão	Quinta do Marim, Laranjeiro, Bías do Norte, Bías do Sul, Armona, Moncarapacho
	Tavira	Tavira, Barrocais de Stª Catarina
	Alcoutim	Areeiro-Lorena, Cortes Pareiras, Rocia, Horta-Barranco das Figueiras, Balurcos, Cruzamento, Vila de Alcoutim, Cocheia, Corte da seda
Barlavento	Silves	Silves
	Lagos	Lagos, Cerca Nova-Barão de Sº João, Portelas, Montes Brancos, Fonte coberta, Pontáis-Odiáxere, Colipo, Odiáxere, Monte Judeo
	Portimão	Maxilhoeira Grande, Cabeço do Mocho, Quinta da Boia, Morgado d'Árges, Monte Velho
	Albufeira	Alfontes-Boliqueime, Paderne
	Lagoa	Estombar
	Vila do Bispo	Quinta dos Pedregais, Vale do Boi
	Aljezur	Canil, Aljezur, Bortual, Vale da Fonte, Samouqueira

A captura dos flebótomos, através da colocação de armadilhas, foi realizada em casas de campo com quintais e/ou jardins, e quintas. As armadilhas foram colocadas, no máximo, a 150 centímetros do solo, ao fim do dia e retiradas na manhã seguinte, de preferência em biótopos abrigados ou sem vento.

Os flebótomos capturados foram preservados, à temperatura ambiente, em etanol a 70% em tubos de polietileno com 6 ml de capacidade devidamente etiquetados (região/nº do biótopo/data), e transportados para a Unidade de Entomológica Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT).

### 3.3. Identificação morfológica dos flebótomos capturados

As espécies flebotomínicas foram identificadas pela Professora Doutora Maria Odete Afonso, da Unidade de Entomologia do IHMT, recorrendo a chaves dicotómicas (Pires, 1979).

Para a identificação das espécies dos flebótomos machos, observaram-se, individualmente, todos os exemplares capturados, ao estereomicroscópio, observando-se todas as características morfológicas, particularmente as genitálias.

No que diz respeito às fêmeas, estas foram, individualmente, colocadas em lâminas de vidro, onde se procedeu à dissecação dos dois-três últimos segmentos abdominais, os quais foram colocados em soluto de Marc André (soluto esclarecedor) para, após colocação de microlamelas, serem observadas, ao microscópio óptico, as características morfológicas das espermatecas. A cabeça, o tórax e o abdómen de cada fêmea, menos os últimos segmentos abdominais que tinham sido retirados, foram colocados individualmente em microtubos com 100 µl de tampão de lise (Kit High Pure PCR Template, Roche) e congelados a -20°C para posterior extracção do DNA.

Durante a identificação das espécies flebotômicas fêmeas foram também registados os estados alimentares (refeição sanguínea completa; parcial; digerida; ausência) e a presença ou ausência de ovos no abdómen (grávida/não grávida).

### **3.4. Pesquisa de infecção por *Leishmania* nos flebótomos através de reacção de PCR**

#### **3.4.1. Extracção de DNA**

As fêmeas dos flebótomos foram maceradas individualmente no microtubo com tampão de lise. A extracção de DNA foi realizada com o Kit High Pure PCR Template de acordo com as instruções da casa comercial. O DNA extraído foi eluído em 100 µl de tampão de eluição. As amostras foram conservadas a -20 °C até posterior utilização na técnica de PCR.

Como controlo positivo da execução da técnica de extracção de DNA utilizou-se a região ITS-2 do genoma dos flebótomos utilizando sequências iniciadoras desenhadas a partir das regiões conservadas codificantes 5.8S e 28S do DNA ribossomal resultando num produto de amplificação de 459 pb (Collins & Paskewitz, 1996; Di Muccio *et al.*, 2000).

#### **3.4.2. Reacção de PCR**

Após identificação das espécies, todas as fêmeas foram analisadas pela técnica de PCR para pesquisa de DNA de *Leishmania* spp.

##### **3.4.2.1. Sequências iniciadoras cinetoplastídeais**

Para pesquisar a infecção por *L. infantum* nas fêmeas das espécies *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* foi utilizada uma reacção de PCR cujo DNA alvo do parasita foram os minicírculos de kDNA.

Nesta reacção de PCR foram utilizados as sequências iniciadoras MC1 e MC2 (Quadro III) (Cortes *et al.*, 2004). A utilização destas sequências iniciadoras resulta num produto de amplificação de PCR de 447 pb. Preparou-se, para cada amostra (5 µl de DNA), 45 µl de uma mistura de reacção constituída por 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.2 mM dNTP's, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM de cada sequência iniciadora (MC1 e MC2) e 1 U de *Taq* DNA polymerase (Promega) e água ultra pura para perfazer o volume final.

As condições óptimas para as amplificações por PCR foram as seguintes: desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C e 30 ciclos de 20 segundos a 94°C (desnaturação), 20 segundos a 60°C (ligação das sequências iniciadoras) e 30 segundos a 72°C (elongação); no fim dos ciclos, uma elongação final de 5 minutos a 72°C. As misturas de reacção foram posteriormente colocadas no termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation) que foi programado com as condições óptimas de amplificação.

Em todas as amplificações utilizou-se como controlo positivo DNA genómico de *L. infantum* e como controlo negativo água ultra pura em substituição do DNA.

#### 3.4.2.2. Sequências iniciadoras ribossomais

Para a pesquisa de infecção por outras espécies de *Leishmania* utilizaram-se, nas fêmeas *P. sergenti* e *Sergentomyia minuta*, as sequências iniciadores do marcador molecular da região ITS-1 (Quadro III) que se encontram entre os genes codificantes para os operões ribossomais 18S e 5.8S do parasita (El Tai *et al.*, 2000).

A reacção de amplificação efectuou-se numa solução com o volume final de 50 µL, contendo 2 µL de DNA da amostra, tampão de reacção NH<sub>4</sub> 1X [16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 67 mM tris-HCl (pH 8.8)], 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 10 pmol de cada sequência iniciadora, 1U de *Taq* polimerase e água ultra pura para perfazer o volume final. As misturas de reacção foram posteriormente colocadas no termociclador Px2 Thermal Cycler que foi programado com as seguintes condições para a amplificação por PCR: desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos seguida por 32 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C durante 20 segundos, ligação das sequências iniciadoras a 53°C durante 30 segundos e elongação a 72°C durante 1 minuto) e no final elongação a 72°C durante 7 minutos.

Tal como nas PCR realizadas com as sequências iniciadoras MC, em todas as amplificações, utilizou-se como controlo positivo DNA genómico de *L. infantum* e como controlo negativo água ultra pura em substituição do DNA.

A preparação de todas as reacções de PCR foi realizada numa área independente, de forma a eliminar possíveis contaminações.

Quadro III- Sequências iniciadoras e condições dos ensaios de PCR utilizados neste estudo.

Ensaio	Sequências iniciadoras ( <i>primers</i> )	Produto PCR	Condições de PCR	Protocolo de amplificação	Nº ciclos	Referência
PCR	MC1 (5'-GTTAGCCGATGGTGGTCTTG-3')	447 pb	16 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Desnaturação 94°C- 20 seg.	30	Cortes <i>et al.</i> , 2004
			67 mM Tris-HCl	Ligação dos <i>Primers</i> 60 °C-20 seg.		
	MC2 (5'-CACCCATTTTCCGATTTTG-3')		0.2 mM dNTP's	Elongação 72 °C-30 seg.		
			1.5 mM MgCl <sub>2</sub>			
			1 U de Taq DNA polymerase			
PCR ITS 1	L5.8S (5'- TGATACCACTTATCGCACTT - 3')	Varia conforme espécie de <i>Leishmania</i>	16 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Desnaturação 95°C- 20 seg.	32	El Tai <i>et al.</i> , 2000
			67 mM Tris-HCl	Ligação dos <i>Primers</i> 53 °C-30 seg.		
	LITSR (5'- CTGGATCATTTTCCGATG - 3')		0.2 mM dNTP's	Elongação 72 °C-1min		
			1.5 mM MgCl <sub>2</sub>			
			1 U de Taq DNA polymerase			
PCR refeições sanguíneas	cytB1-F (5'-CCA TCC AAC ATY TCA DCA TGA TGA AA-3')	350 pb		Desnaturação 94°C- 1 min.	40	Svobodová <i>et al.</i> , 2008
			Biomix (BIONLINE)	Ligação dos <i>Primers</i> 55 °C-1 min.		
	cytB2-R (5'- GCH CCT CAG AAT GAT ATT TKG CCT CA-3')		5U/μl Taq DNA polymerase	Elongação 72 °C-1min		

### 3.4.3. Visualização dos produtos de PCR

As amostras de DNA amplificado foram submetidas a electroforese em gel de agarose a 1,5%. Preparou-se o gel por dissolução de 1,5 g de agarose pura (Stratagene), em 100 mL de tampão TAE 1X (0,04M Tris-Hcl a pH 8; 0,002M EDTA; 0,02 M acetato de sódio) corado com 0.5 μg/ml brometo de etídio (Sigma). Após polimerização, o gel foi colocado na tina de electroforese com tampão TAE 1X. Aplicou-se, no gel, 5μl de produto PCR de cada amostra, ao qual se adicionou previamente 2 μl de solução corante Laranja G [40% (w/v) de sucrose (BDH) em 0,25% de Laranja G; (Merck)], assim como um marcador de 100 pb. Aplicou-se uma corrente eléctrica de 110 volts durante 60 minutos. A visualização, dos produtos de amplificação no gel, efectuou-se sob iluminação ultravioleta, sendo de seguida fotografados no sistema UVIDOC (Alfagene).



### 3.5. Identificação das preferências hemáticas dos flebótomos fêmeas através de reacção de PCR

Para a identificação das refeições sanguíneas, das fêmeas de flebótomos alimentadas, foram utilizadas sequências iniciadoras cyt B1-F e cyt B2-R (Quadro III) para amplificar um segmento do gene do citocromo B do DNA mitocondrial do hospedeiro com 350 pb (Svobodová *et al.*, 2008).

Para cada amostra foram preparados 20 µl de mistura de reacção constituída por, 12,5 µl de Biomix (BIONLINE), 10 pmol/ul de cada sequência iniciadora e 5U/µl de *Taq* DNA polymerase e água ultra pura para perfazer o volume final.

As condições para a amplificação por PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos seguida por 40 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto) e no final elongação a 72°C durante 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram visualizados num gel de agarose a 1,5 % em 1X tampão TAE corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Aplicou-se no gel 5 µL do produto de PCR de cada amostra ao qual se adicionou previamente 2 µl de solução corante Laranja G e um marcador de massa molecular de 100 pb.

#### 3.5.1. Purificação dos produtos amplificados por PCR

Os produtos de PCR das amostras positivas, para a amplificação do gene do cyt B e o DNA das fêmeas positivas para *Leishmania*, foram purificados com o kit comercial “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche).

Este kit baseia-se na ligação específica do DNA amplificado, a uma fibra de vidro existente na coluna de purificação, na presença de tiocianato de guanidina. O DNA é purificado, através de diversas lavagens e centrifugações, com o objectivo de remover as sequências iniciadoras, nucleótidos e outros sais resultantes da PCR. Por fim, o DNA é eluído entre 50-100 µl através de uma solução de baixa concentração salina.

### **3.5.2. Sequenciação dos produtos de PCR purificados**

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados em ambas as cadeias de DNA através do serviço de sequenciação StabVida (Portugal) utilizando as mesmas sequências iniciadoras usadas na amplificação do DNA mitocondrial. As sequências obtidas na sequenciação foram comparadas com as sequências da base de dados GenBank utilizando a pesquisa de nucléotídeos padrão BLAST.

Homologias das sequências (isto é, percentagem de identidade entre os nucleótidos das sequências inseridas do GenBank e os da sequência da amostra) com os dados do GenBank a partir de 90% indicam um elevado grau de confiança.

## IV. RESULTADOS

De Março a Novembro de 2007, foram prospectados 175 biótopos em 57 localidades de 12 concelhos da RA (Figura 15), dos quais 119 foram distribuídos por 32 localidades do Sotavento Algarvio e 56 em 25 localidades do Barlavento Algarvio (Quadro IV). Foram capturados flebótomos em 60 biótopos (biótopos positivos).

A vegetação encontrada nos 175 biótopos prospectados era constituída por pinheiros, acácias, alfarrobeiras, oliveiras, loureiros, bambu, canavial, aroeira, árvores de fruto (laranjeiras, pessegueiros, figueiras, nespereiras, romãzeiras, amendoeiras, tamareiras, videiras, mangueiras, nogueiras) e plantas ornamentais (Quadro IV).

Para além do ser humano e de cães, presentes na maioria dos biótopos, os principais hospedeiros vertebrados existentes, e visíveis, foram: gatos, bovinos, ovinos, caprinos, suínos, equinos, coelhos e aves (de capoeira e exóticas) (Quadro IV).



Figura 15 – Região do Algarve. Os 12 concelhos estudados estão representados a verde.

Quadro IV – Caracterização da vegetação e dos animais presentes nas localidades estudadas.

	Concelho	Localidade	Temperatura °C		Animais	Vegetação
			Máxima	Mínima		
Barlavento	Silves	Silves	23	15	cães (2), aves (30)	Tamareiras, Pessegueiros, Mangueiras
	Lagos	Cerca Nova - Barão de S.João	17,7	10,7	cães (9), gatos (2)	Árvores diversas
		Portelas	37	14	cães (4)	
		Pontais/Odiáxere	32	10	cães (4)	
		Fonte coberta	30	10	cães (3)	
		Colipo	27	9	cães (2)	Pinheiros
		Odiáxere	24	8	Cães (2)	
		Matos Brancos	38	10	cães (2)	
		Monte Judeo	27	8	cão (1)	
		Lagos	23	7	cão (1)	
	Aljezur	Canil de Aljezur	29	14	cães (16)	Pessegueiros e Figueira
		Aljezur	28	21	cães (5), gatos (14)	
		Bortual	32	13	cães (2)	
		Vale da Fonte	24	7	cães (2)	
		Samouqueia	23	7	cães (7)	
	Albufeira	Alfontes, Boliqeime	28,5	16	cão (1)	Alfarrobeira
		Paderne	30	19	aves (22)	Laranjeiras e ornamentais
		Paderne	29,2	18,6	cães (3), aves (20), caprinos (2)	Laranjeiras e ornamentais
	Vila do Bispo	Quinta dos Pedregais	38	11	cães (7)	
		Vale do Boi	25	7	cães (3)	
	Portimão	Mexilhoeira Grande	28	10	aves (80)	Pinheiros
		Cabeço do Mocho	21	12	cães (4)	Pinheiros, diversos
		Quinta da Boina	32	9	cães (4), bovinos	Arvoredo/Árvores diversas
		Morgado d'Arges	30	6	cães (2), bovinos	
		Monte Velho	28	9	cães (4)	Pinheiros
		Mexilhoeira Grande	24	7	cães (3)	
	Lagoa	Estombar	26	9	cães (3)	
Sotavento	Olhão	Quinta de Marim	25	11	cães (5)	Pinheiro, canavial aroeira, alfarrobeira
		Quinta de Marim	28	7,8	cães (5), aves (45)	Pinheiro, canavial aroeira, alfarrobeira
		Laranjeiro	14,8	10	cães (3), vários galináceos	Wisteria sinensis (cobertura do canil)
		Bias do Norte	26	15	aves (20)	Alfarrobeira, oliveira
		Bias do Norte	28	14,6	cão (1), aves (20)	Alfarrobeira, oliveira
		Armona	24	17	cães (2), gatos (2)	
		Bias do Sul	24	9	cães (3), aves (4)	Figueiras, Laranjeiras, Videiras, pessegueiros, ornamentais
		Moncarapacho			cão (1)	Laranjeiras, árvore da borracha, vegetação ornamental diversa (jardim)
	Faro	Quinta da Galvana	31	10	cães (4), aves (8)	Alfarrobeira, bambus, plantas diversas (jardim)
		Goldra	16,2	11,9	cães (2), gatos (6)	Alfarrobeira, Oliveiras, Amendoeira, Medronheiros, Pistácea
		Gambelinhãs	23,3	13,7	gatos (4), cães (3)	Buganvileas
		Montenegro	32	22	cães (2), gato (1), aves (6)	Pinheiros
		Montenegro	31	22	cães (3), aves (12)	Videiras e ornamentais (jardim)
		Montenegro	25	20	cães (3), aves (17)	Amendoeiras, laranjeiras, ornamentais (jardim/horta)
		Montenegro	23	19	Coelhos, aves, pássaros	Macieiras, pessegueiros, ameixeiras, romãs, figueiras, goiabeiras, bananeiras
		Gambelas	32,4	23	cão (1), gatos (5)	Abacareiros, Nespereira, Ornamentais
		Universidade	30	28	Animais selvagens (coelhos, aves)	Pinheiros
		Alcaria Cova/Estoi	26	17	cães (4)	Pinheiros
		Santo António do Alto	26	20	cão (1)	Plantas ornamentais, pinheiros, ciprestes
		Aeroporto	27	20	aves (10)	Roseiras, nespereiras, laranjeiras, ornamentais
	Loulé	Quinta da Marroquia	19	12	cães (2)	Figueiras, alfarrobeiras, amendoeiras, laranjeiras, romanzeiras Nogueiras, nespereiras, Laranjeiras, Alfarrobeira Jardim com ornamentais variada Loureiros, ornamentais e relvado
		Sobradinho de Alfeição	30	10	cães (2), gatos (4)	
		Goncinha	28	24	cães (9)	
		Loulé	32	18	cães (3), gato (1)	
		Benafim/Quinta do freixo	24	9	ovinos (50)	
	Tavira	Paula Farrajota	24	10	cães (5)	
		Tavira	32	20	cães (2)	Laranjeiras
	Alcoutim	Barrocais Santa Catarina	33	20	cães (3), gatos (3)	Alfarrobeira
		Cortes Pereiras	23	9	cão(1), bovinos (50)	
		Rocio	29	20	suínos (5)	
		Horta/Barranco das Figueiras	27	17	cães , suínos, caprinos, ovinos, galináceos	Alfarrobeira
		Balurocos	26	12	32 (caprinos, suínos, ovinos, galináceos)	Alfarrobeiras
		Cruzamento	25	20	burro , galináceos , suínos, cães, caprinos	Alfarrobeiras
		Vila de Alcoutim	25	11	aves (6)	Alfarrobeira
		Cocheia	23	14	cães (4)	
		Corte da seda	21	12	23 (bovinos, ovinos, burro, suínos, cães)	
		Areiro/Lorenha	20	12	35 (suínos, ecanídeos e galináceos)	

#### 4.1. Abundância relativa das espécies flebotomínicas capturadas na Região do Algarve

Foi capturado um total de 1595 flebótomos: 742 (46,5%) machos e 853 (53,5%) fêmeas.

A abundância relativa das espécies foi de 86,3% para *P. perniciosus*, 10,5% para *S. minuta*, 2,5% para *P. ariasi* e 0,7% para *P. sergenti*. Não foram capturados exemplares de *P. papatasi* (Tabela 1).

Tabela 1 – Número total de flebótomos capturados na Região do Algarve e abundância relativa das espécies.

2007				
Espécie	♂	♀	Total	%
<i>P. perniciosus</i>	667	773	1440	86,59
<i>P. ariasi</i>	16	24	40	2,5
<i>P. sergenti</i>	2	9	11	0,66
<i>P. papatasi</i>	0	0	0	0
<i>S. minuta</i>	90	82	172	10,35
<b>Total</b>	<b>775</b>	<b>888</b>	<b>1663</b>	<b>100</b>

O concelho onde se registou o maior número de capturas de flebótomos foi o de Olhão, com 476 exemplares, seguido pelo concelho de Albufeira com 298. Os concelhos com o maior número de biótopos negativos (ausência de flebótomos capturados) foram os de Faro, no Sotavento Algarvio e Portimão e Lagos no Barlavento (Quadro V).

Quadro V – Número total das espécies flebotomínicas capturadas por concelhos e localidades.

Concelho	Localidade	Nº de biótopos	<i>P. perniciosus</i> ♀	<i>P. ariasi</i> ♀	<i>P. sergenti</i> ♀	<i>S. minuta</i> ♀	Total ♀	Total ♂	Total ♂+♀
Silves	Silves	5	130	2	0	0	132	113	245
Lagos	Cerca Nova - Barão de S.João	3	0	0	0	0	0	0	0
	Portelas	2	0	0	0	0	0	0	0
	Pontais/Odiáxere	2	0	0	0	0	0	0	0
	Fonte coberta	3	1	0	0	0	1	0	1
	Colipo	1	0	0	0	0	0	0	0
	Odiáxere	1	1	0	0	0	1	0	1
	Matos Brancos	3	3	0	0	0	3	0	3
	Monte Judeo	2	0	0	0	0	0	0	0
	Lagos	2	0	0	0	0	0	1	1
Aljezur	Canil de Aljezur	1	19	4	0	3	26	43	69
	Aljezur	1	5	0	0	0	5	3	8
	Bortual	2	3	0	0	2	5	20	25
	Vale da Fonte	1	0	0	0	0	0	0	0
	Samouqueia	1	1	0	0	0	1	0	1
Albufeira	Alfontes, Boliqueime	2	0	0	0	0	0	2	2
	Paderne	6	155	7	0	20	182	114	296
Vila do Bispo	Quinta dos Pedregais	3	30	0	0	3	33	46	79
	Vale do Boi	2	0	0	0	0	0	0	0
Portimão	Mexilhoeira Grande	5	0	0	0	0	0	1	1
	Cabeço do Mocho	1	0	0	0	0	0	0	0
	Quinta da Boina	2	0	0	0	0	0	0	0
	Morgado d'Arges	2	1	0	0	0	1	0	1
	Monte Velho	2	0	0	0	0	0	0	0
Lagoa	Estombar	1	0	0	0	0	0	0	0
Olhão	Quinta de Marim	10	0	0	0	0	0	0	0
	Laranjeiro	7	188	4	0	11	203	131	334
	Bias do Norte	8	33	0	5	0	38	79	117
	Armona	2	0	0	0	0	0	0	0
	Bias do Sul	6	3	0	0	0	3	10	13
	Moncarapacho	1	5	0	2	0	7	5	12
Faro	Quinta da Galvana	3	0	0	0	0	0	0	0
	Goldra	1	0	0	0	0	0	0	0
	Gambelinhas	2	0	0	0	0	0	0	0
	Montenegro	8	0	0	0	0	0	0	0
	Gambelas	3	0	0	0	0	0	2	2
	Universidade	1	0	0	0	0	0	0	0
	Alcaria Cova/Estoi	2	0	0	0	0	0	0	0
	Santo António do Alto	3	0	0	0	0	0	0	0
	Aeroporto	1	0	0	0	0	0	0	0
Loulé	Quinta da Marroquia	4	0	0	0	0	0	0	0
	Sobradinho de Alfeição	7	7	1	0	0	8	1	9
	Goncinha	4	3	0	0	2	5	0	5
	Loulé	3	3	0	0	0	3	1	4
	Benafim/Quinta do freixo	11	5	1	0	1	7	6	13
	Paula Farrajota	3	0	0	0	0	0	0	0
Tavira	Tavira	6	38	0	0	0	38	13	51
	Barrocais Santa Catarina	6	43	3	2	34	82	70	152
Alcoutim	Cortes Pereiras	9	44	1	0	5	50	71	121
	Rocio	1	5	0	0	0	5	0	5
	Horta/Barranco das Figueiras	1	0	0	0	0	0	0	0
	Balurcos	1	1	0	0	0	1	1	2
	Cruzamento	1	10	0	0	0	10	8	18
	Vila de Alcoutim	1	0	0	0	0	0	0	0
	Cocheia	1	1	0	0	0	1	1	2
	Corte da seda	1	1	1	0	0	2	0	2
	Areeiro/Loreinha	1	0	0	0	0	0	0	0
Total		175	739	24	9	81	853	742	1595

## 4.2. Associação das espécies flebotomínicas

Relativamente às associações de espécies de flebótomos adultos capturados nos 175 biótopos prospectados, foram encontrados *P. perniciosus* isoladamente 28 vezes e *S. minuta* uma vez, enquanto as espécies *P. ariasi* e *P. sergenti*, foram sempre capturadas associadas a outras espécies. (Tabela 2).

Tabela 2 - Associações das espécies de flebótomos capturadas com as armadilhas luminosas CDC.

	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>S. minuta</i>
<i>P. perniciosus</i>	28	16	5	22
<i>P. ariasi</i>	16	0	2	7
<i>P. sergenti</i>	5	2	0	2
<i>S. minuta</i>	22	7	2	1

## 4.3. Densidades das espécies flebotomínicas

Segundo a OMS, a densidade flebotomínica é calculada através do número de flebótomos, de cada espécie, capturados por armadilhas luminosas CDC por noite (mês) (WHO, 1990).

Como se pode verificar na Quadro VI, embora as densidades flebotomínicas tenham variado conforme as espécies, de uma forma geral, as maiores densidades corresponderam aos meses mais quentes, Junho e Julho. No mês de Setembro verificou-se um segundo pico para as espécies *P. perniciosus*, *P. ariasi* e *S. minuta*.

Quadro VI – Densidades das espécies flebotomínicas na Região do Algarve, de Março a Novembro de 2007.

Espécie de flebótomo	Mês*									
	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	
<i>P. perniciosus</i>	0,75	0,00	0,00	19,90	16,84	0,20	11,21	3,89	0,00	
<i>P. ariasi</i>	0,00	0,00	0,00	0,20	0,88	0,00	0,19	0,17	0,00	
<i>P. sergenti</i>	0,00	0,00	0,00	0,30	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	
<i>P. papatasi</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
<i>S. minuta</i>	0,33	0,00	0,00	0,25	4,64	0,20	0,90	0,22	0,00	
<b>Total*</b>	1,08	0,00	0,00	20,65	22,56	0,40	12,30	4,28	0,00	

\* Densidade flebotomínica = N° total de flebótomos/ armadilhas luminosas CDC (mês)

#### 4.4. *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* Newstead, 1917

##### 4.4.1. Distribuição geográfica

*P. perniciosus* encontra-se amplamente distribuído, desde a costa ocidental da Europa e Ilhas Canárias (Martinez-Ortega, 1988) até à Turquia (Moulaheem *et al.*, 1998) e da Europa setentrional (Maret, 1923) até ao Sul da Argélia (Lewis, 1982).

Em Portugal, *P. perniciosus* foi descrito pela primeira vez, em Colares (Sintra) e no Porto, por França (1918). Esta espécie encontra-se amplamente distribuída pelo território Continental, desde Bragança até ao Algarve (Pires, 1979).

Neste estudo, *P. perniciosus* foi capturado em todos os concelhos estudados, com excepção de Faro (Quadro V). Dos 175 biótopos prospectados, 59 foram positivos para esta espécie.

##### 4.4.2. Densidade flebotomínica

*P. perniciosus*, foi a espécie flebotomínica mais abundante na RA, apresentando um ciclo bifásico, iniciando a sua actividade em Junho com uma densidade de 19,90, quase desaparecendo em Agosto com uma densidade de 0,2, atingindo um segundo pico com uma densidade de 11,21 em Setembro, desaparecendo, por fim, em Novembro (Figura 16).

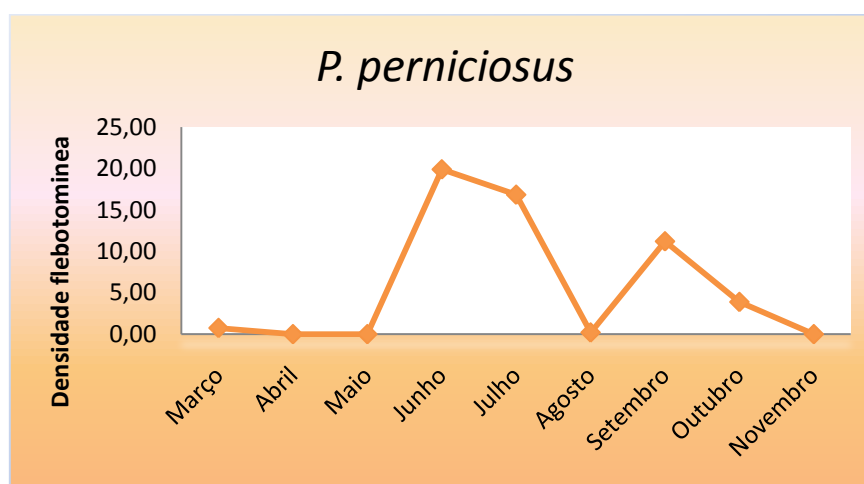


Figura 16 – Densidade de *P. perniciosus* na Região do Algarve de Março a Novembro de 2007.



#### 4.4.3. Associação de espécies

*P. perniciosus*, foi encontrado associado a *P. ariasi* 16 vezes, a *P. sergenti* 5 vezes e a *S. minuta* 22 vezes (Tabela 2).

### 4.5. *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921

#### 4.5.1. Distribuição geográfica

A presença de *P. ariasi* é assinalada, no Sul de França, por Nitzulescu (1930), na Argélia, por Parrot (1936), em Marrocos, por Gaud (1947) e na Tunísia, por Croset *et al.* (1966). Em Itália, esta espécie foi descrita, pela primeira vez, por Rioux *et al.* (1964), e foi também encontrada nas ilhas Canárias (Perrotey, 1994; Léger *et al.*, 1995). Considera-se que a área de distribuição de *P. ariasi* é a parte ocidental da Sub-região Mediterrânica, provavelmente por esta área apresentar características climáticas favoráveis a esta espécie, nomeadamente uma maior humidade e um Inverno com temperaturas moderadas.

Em Portugal, *P. ariasi* foi assinalado, pela primeira vez, por Meira & Ferreira, em 1944, em Benfica (Lisboa), Cacém, Carnide, Colares e Odivelas e posteriormente na RAD, Arrábida e no Sotavento Algarvio (Pires, 2000).

No presente estudo, *P. ariasi* foi capturado nos concelhos de Silves, Aljezur, Albufeira, Olhão, Loulé, Alcoutim (Quadro V). Dos 175 biótopos prospectados, 16 foram positivos para *P. ariasi*.

#### 4.5.2. Densidade flebotomínica

A densidade de *P. ariasi*, mostra que esta espécie é pouco abundante na RA tendo-se verificado a sua maior densidade em Julho (0,90) (Figura 17).

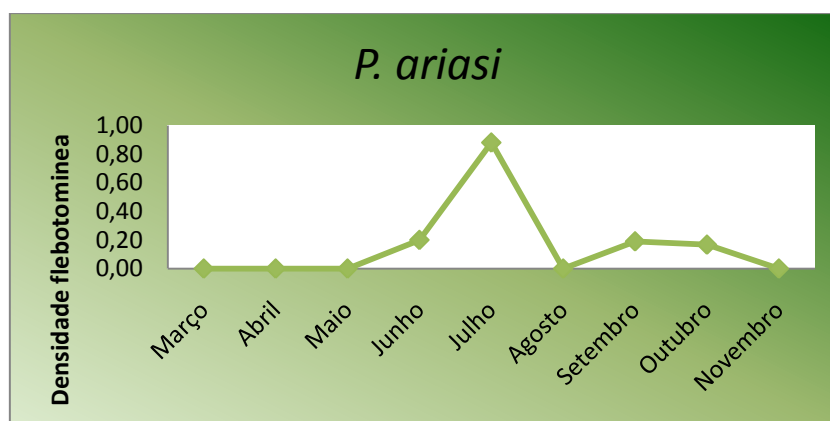


Figura 17 – Densidade de *P. ariasi* na Região do Algarve de Março a Novembro de 2007.

#### 4.5.3. Associação de espécies

*P. ariasi*, foi capturado associado a *P. perniciosus* 16 vezes, duas vezes a *P. sergenti* e sete vezes a *S. minuta* (Tabela 2).

### 4.6. *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917

#### 4.6.1. Distribuição geográfica

*P. sergenti* foi descrito por Parrot, em 1917, a partir de um macho capturado em Constantina, na Argélia.

A distribuição de *P. sergenti*, no Velho Mundo, é muito vasta, estendendo-se desde as Canárias e Madeira, a Oeste, até à Índia, a Leste e do Sul de França e da Sicília, a Norte, até à Etiópia, a Sul (Seccombe *et al.*, 1993; Pires & Capela, 1996; Maroli *et al.*, 1998; Depaquit *et al.*, 1998).

O conhecimento actual da distribuição de *P. sergenti*, em Portugal Continental, mostra que é mais abundante a Sul da bacia hidrográfica do Tejo e escassa a Norte (Afonso *et al.*, 2005).

Neste estudo foram capturados *P. sergenti* em cinco biótopos distribuídos pelos concelhos de Olhão e Tavira (Quadro V).

#### 4.6.2. Densidade flebotomínica

Excluindo *P. papatasi*, que não foi capturado, *P. sergenti* foi a espécie flebotomínica menos frequente nesta região. Apresentou um ciclo nitidamente monofásico, com um curto período de actividade, de Junho (com uma densidade de 0,3), a Agosto (Figura 18).

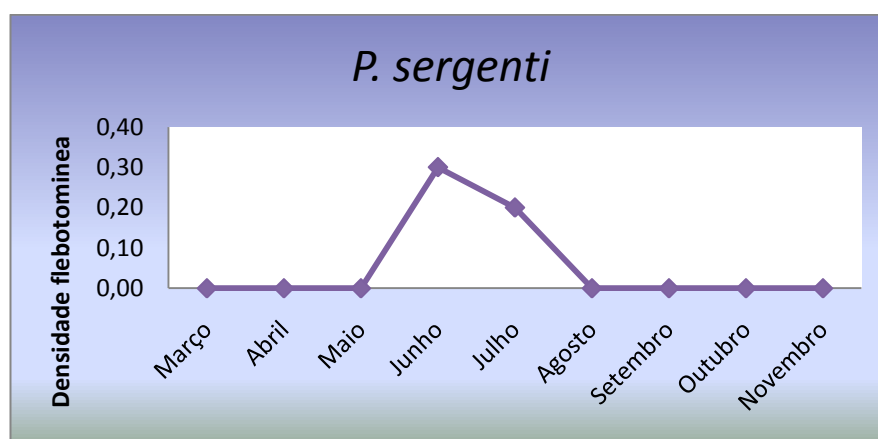


Figura 18 – Densidade de *P. sergenti* na Região do Algarve de Março a Novembro de 2007.

#### 4.6.3. Associação de espécies

*P. sergenti*, foi capturado associado a *P. perniciosus* cinco vezes, duas vezes a *P. ariasi* e duas vezes a *S. minuta* (Tabela 2).

### 4.7. *Sergentomyia* (*Sergentomyia*) *minuta* Rondani, 1843

#### 4.7.1. Distribuição geográfica

*Sergentomyia minuta* foi descrita como *Phlebotomus minuta* por Camille Rondani, em 1843, a partir de um exemplar capturado no Norte de Itália (Parma).

A sua distribuição geográfica engloba toda a parte ocidental da Bacia Mediterrânica, (Abonnenc, 1972; Seccombe *et al.*, 1993). Encontra-se também em quatro ilhas do arquipélago das Canárias (Morillas-Marquez *et al.*, 1984; Lane & Alexander, 1988; Perrotey, 1994) e na Madeira (Alves-Pires *et al.*, 1997).

Em Portugal Continental, esta espécie foi encontrada, pela primeira vez, em Lisboa e arredores, por Meira & Ferreira (1944). Foi assinalada no Alto Douro, (Rés, 1957), no Algarve (Pires, 1979; Schrey *et al.* 1989) e no distrito de Évora (Semião-Santos *et al.*, 1995).

Neste estudo, foram capturados *S. minuta* em 23 biótopos nos concelhos de Aljezur, Albufeira, Vila do Bispo, Olhão, Loulé, Tavira e Alcoutim (Quadro V).

#### 4.7.2. Densidade flebotomínica

*S. minuta* foi a segunda espécie mais abundante nesta região, apresentando um ciclo bifásico, com o pico de maior densidade (4,64) em Julho e um segundo pico de densidade (0,9) em Setembro (Figura 19).

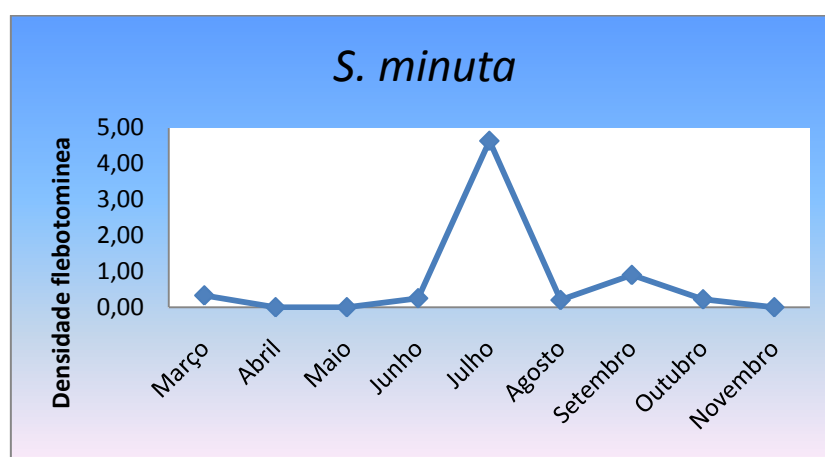


Figura 19 – Densidade de *S. minuta* na Região do Algarve de Março a Novembro de 2007.

#### 4.7.3. Associação de espécies

*S. minuta*, foi capturada associada a *P. perniciosus* 22 vezes, sete vezes a *P. ariasi* e duas vezes a *P. sergenti* (Tabela 2).

#### 4.8. Pesquisa de infecção por *Leishmania* nos flebótomos capturados

Nas 763 fêmeas de *P. perniciosus* e *P. ariasi* capturadas foram utilizadas as sequências iniciadoras para amplificar os minicírculos de kDNA da *L. infantum* (Figura 20). Em 91 fêmeas de *P. sergenti* e *S. minuta* foram efectuadas reacções de PCR para amplificar a região ITS-1 ribossomal de *Leishmania*.

Foi detectado DNA de *L. infantum* numa fêmea de *P. perniciosus* capturada em Setembro, no concelho de Olhão, pelo que neste estudo, a taxa de infecção de *P. perniciosus* foi de 0,14% (1/739), a taxa de infecção dos dois vectores de *L. infantum*, comprovados em Portugal (*P. perniciosus* e *P. ariasi*), foi de 0,13% (1/763) e a taxa total de infecção das fêmeas, capturadas na Região do Algarve, foi de 0,12% (1/853). No biótopo onde foi capturada a fêmea infectada existiam quatro cães, dois gatos, nove galináceos (seis galinhas e três galinhas da Índia), dois cavalos e sete seres humanos. Nos arredores pastavam rebanhos de ovinos.

Não foi detectado DNA de *Leishmania* nas fêmeas de *P. sergenti*, *P. ariasi* e *S. minuta*.

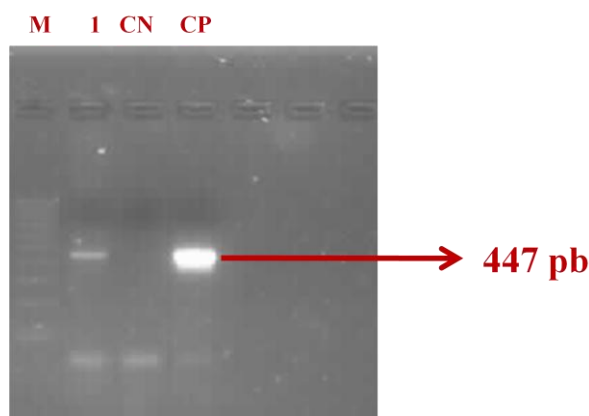


Figura 20 – Fotografia de gel de agarose onde migraram, por electroforese, produtos de amplificação de PCR com sequências iniciadoras MC. M- Marcador de peso molecular de 100pb; 1 – Amostra positiva; CN-Controlo negativo; CP- Controlo positivo.

#### 4.9. Análise das refeições sanguíneas das fêmeas capturadas

Das 853 fêmeas, 55 estavam grávidas e 59 alimentadas (refeição sanguínea total ou parcial) (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de fêmeas grávidas e com refeições sanguíneas, por espécie, capturadas na Região do Algarve.

2007		
Espécie	Fêmeas grávidas	Fêmeas alimentadas
<i>P. perniciosus</i>	26	52
<i>P. ariasi</i>	3	3
<i>P. sergenti</i>	3	2
<i>S. minuta</i>	23	2
<b>Total</b>	55	59

Através da utilização de sequências iniciadoras universais que amplificam o gene cyt B dos hospedeiros vertebrados, seguido de sequenciação dos produtos de PCR e emparelhamento no GenBank do produto amplificado, foi possível identificar 41 refeições sanguíneas das 59 fêmeas alimentadas das diferentes espécies flebotomínicas. Não foi encontrada homologia significativa em 5 fêmeas da espécie *P. perniciosus* em que houve amplificação do cyt B (Figura 21).

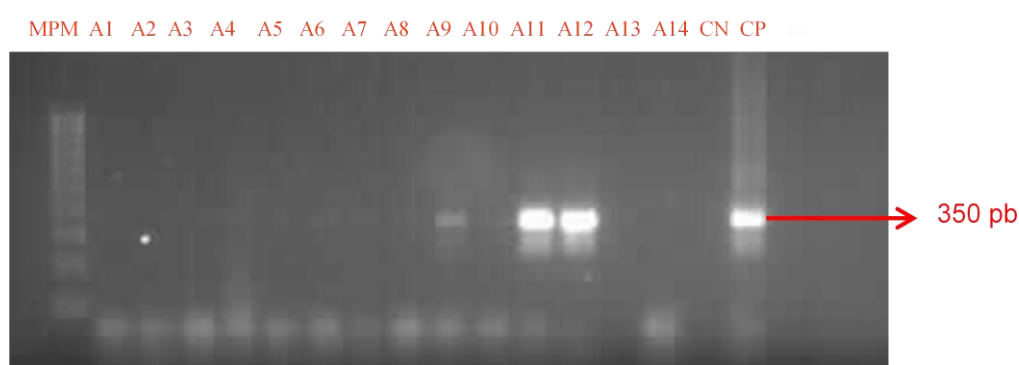


Figura 21 – Fotografia de gel de agarose onde migraram, por electroforese, produtos de amplificação de PCR com sequências iniciadoras universais cyt B. M- Marcador de peso molecular de 100pb; Amostras 9, 11 e 12 positivas; CN- Controlo negativo; CP- Controlo positivo.

As fêmeas de *P. perniciosus* alimentaram-se maioritariamente em roedores, mas também em aves (galináceas) e num gato. *P. ariasi* alimentaram-se, preferencialmente, em galináceos e répteis, *P. sergenti* em aves e *S. minuta* em répteis (Tabela 4).

Tabela 4 – Identificação das fontes de alimentação das fêmeas de flebótomos.

Espécie de flebótomo	Fêmeas alimentadas	Identificação da fonte da refeição sanguínea				Total
		Roedores	Aves	Mamíferos (Gato)	Répteis	
<i>P. perniciosus</i>	52	26	3	1	0	30
<i>P. ariasi</i>	3	0	2	0	1	3
<i>P. sergenti</i>	2	0	1	0	0	1
<i>S. minuta</i>	2	0	0	0	2	2
<b>Total</b>	59	26	6	1	3	36

## V. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo Schönian *et al.* (2008), a epidemiologia das leishmanioses está a evoluir rapidamente, tanto na Região Mediterrânica como em outras regiões do Mundo, devido a vários factores, tais como, alterações ambientais e naturais provocadas pelo Homem, migração generalizada de áreas rurais para áreas urbanas e peri-urbanas, alterações do sistema imunitário dos hospedeiros devido, por exemplo, ao aumento da infecção por HIV e falhas terapêuticas.

As alterações climáticas que se estão a verificar, nomeadamente o aumento da temperatura média anual, poderão ter como consequência o aumento da actividade flebotomínica e do número de meses de transmissão do parasita, quer ao Homem, quer aos animais (Ready, 2010). A urbanização é a principal alteração ambiental produzida pelo Homem e está intimamente relacionada com a migração para áreas urbanas devido a factores socioeconómicos, culturais, religiosos, políticos e ambientais (WHO, 2002). O aumento entre as coinfeções de *Leishmania*/HIV é atribuído à urbanização da LV e à ruralização da SIDA, tendo sido registada em 35 países (Desjeux & Alvar, 2003). Devido à inexistência de vacinas eficazes para a leishmaniose humana e canina, a terapêutica, apesar de onerosa e limitada, continua a representar o único mecanismo de controlo. No entanto, a forte pressão selectiva exercida pelos fármacos, promove o aparecimento de quimio-resistências do parasita (Dujardin, 2008). Daí a necessidade e importância de se unirem esforços para se efectuarem estudos no terreno de forma a controlar e prevenir estes factores de risco.

O risco de emergência ou reemergência da(s) leishmaniose(s) na Europa está associado a vários cenários:

- Introdução de espécies de *Leishmania* exóticas neste Continente através do aumento do número das viagens do Homem (Desjeux, 2001) e de cães (Trotz-Williams & Trees, 2003) pelo Mundo.
- Dispersão da leishmaniose visceral e cutânea, causadas por *L. infantum* e *L. tropica*, a partir de Regiões do Mediterrâneo, onde essas espécies são endémicas, para regiões temperadas onde existem vectores mas não existe a doença (Ready, 2010).
- Aumento do número de indivíduos imunodeprimidos. A elevada prevalência de humanos assintomáticos portadores de *L. infantum* no Sul da Europa (Moral *et al.*, 2002; Martín-Sánchez *et al.*, 2004) juntamente com a imunossupressão observada em indivíduos infectados com HIV, é uma ameaça latente deste parasita para a Saúde Pública (Desjeux & Alvar, 2003).



O ciclo de vida de *Leishmania* é complexo e pode envolver diferentes reservatórios e vectores no mesmo foco. O conhecimento das espécies de flebótomos, taxas de infecção, preferências hemáticas, densidades, além de outros aspectos da sua ecologia numa dada região, é essencial para a compreensão da eficácia vectorial e da intensidade da transmissão da leishmaniose e constitui um elemento indicador da sua importância na epidemiologia da transmissão de *Leishmania* (Killick-Kendrick & Ward, 1981; WHO, 1990). A monitorização da infecção natural nas populações flebotomínicas é uma importante ferramenta de vigilância, de previsão do risco, de prevalência da doença, e de avaliação de programas de controlo. Para compreender a dinâmica de um foco de leishmaniose de forma eficiente, é necessária a realização de uma análise das espécies vectoras e das suas preferências de hospedeiros. Devido à baixa taxa de infecção das espécies flebotomínicas em condições naturais, estes estudos requerem o exame individual de centenas, ou mesmo milhares, de flebótomos.

Devido à baixa densidade de *P. ariasi* observada neste estudo, bem como em trabalhos anteriores, este vector comprovado de *L. infantum* na RAD e na RML, parece não desempenhar na RA qualquer papel na transmissão vectorial de leishmanias ao Homem e aos cães (Pires, 2000; Maia *et al.*, 2009). Por outro lado, *P. perniciosus*, foi a espécie dominante nesta região, sendo capturado em 55 biótopos, amplamente distribuídos pela RA. As maiores eclosões registaram-se entre Junho e Julho com elevadas densidades 19,90 e 16,84, respectivamente. Foi possível detectar uma fêmea de *P. perniciosus* infectada com *L. infantum*, o que correspondeu a: uma taxa de infecção de *P. perniciosus* de 0,14% (1/739), uma taxa de infecção dos dois vectores comprovados de *L. infantum* em Portugal de 0,13% (1/763) e uma taxa total de infecção das fêmeas, capturadas na RA, de 0,12% (1/853). Os resultados do presente estudo reforçam o argumento que *P. perniciosus* pode ser considerado o principal, ou mesmo único, vector de leishmaniose na RA, não apenas devido ao facto de ter sido a única espécie encontrada infectada com *L. infantum*, mas também devido à sua grande ubiquidade, aparecendo em vários estados bioclimáticos, com ampla distribuição e abundância. A detecção do exemplar infectado no concelho de Olhão significa que a infecção vectorial por *L. infantum* continua activa na Região do Sotavento Algarvio, tal como observado anteriormente por Schrey *et al.* (1989) e Pires *et al.* (2004).

*S. minuta* é, das cinco espécies encontradas na região, a segunda com maior dispersão. Apresentou, juntamente com *P. perniciosus*, o período de actividade mais longo, estendendo-se de Março a Outubro. Apesar de *Sergentomyia* spp. serem vectoras de sauroleishmanias, que infectam unicamente répteis, já foram encontradas no subcontinente indiano fêmeas infectadas com *L. donovani* durante um surto epidémico de kala-azar (Mukherjee *et al.*, 1997).

Embora neste trabalho se tenham obtido baixas densidades e um curto período de actividade, de Junho a Julho, de *P. sergenti*, foram detectados 5 biótopos positivos distribuídos nos concelhos de Tavira e Olhão. Apesar de não se ter amplificado DNA de *L. tropica* a partir das fêmeas capturadas, a presença de *P. sergenti* na RA, pode resultar na introdução/transmissão de LC, provocada por este parasita, devido à mobilidade de indivíduos provenientes do Norte de África, nomeadamente de Marrocos, por razões comerciais de diferentes tipos, e também devido à presença de turistas provenientes do Médio Oriente. As actuais facilidades de mobilidade da população Algarvia, nomeadamente no sector da pesca, onde se mantêm contactos frequentes com Marrocos, bem como o elevado acréscimo turístico, o número de indivíduos toxicodependentes e/ou portadores de HIV que circulam na região, poderão constituir um excelente reservatório infectante para os flebotomos, o que poderá provocar o aparecimento desta antroponose em Portugal.

Ainda que não tenham sido identificados exemplares de *P. papatasi* durante este estudo, esta espécie flebotomínica, vectora de *L. major*, foi capturada na RA em anos anteriores, pelo que, apesar de o risco da introdução desta espécie de *Leishmania* no nosso país ser reduzido, não deve ser negligenciado (Pires, 2000; Maia *et al.*, 2009).

Apesar de não serem conhecidos em Portugal casos autóctones de leishmaniose causada por *L. tropica* e *L. major*, foram identificados no nosso país casos de LV humana causada por híbridos de *L. major*/ *L. infantum*, facto que levantou questões sobre a possibilidade de trocas genéticas de *Leishmania* no aparelho digestivo do vector e a possível circulação de híbridos em condições naturais (Ravel *et al.*, 2006). Por outro lado, a descoberta de que estes híbridos de *Leishmania* conseguiam completar o seu desenvolvimento em *P. papatasi*, um vector específico de *L. major* refractário à infecção por parasitas do complexo *L. donovani*, poderá ter implicações epidemiológicas importantes, nomeadamente o aumento de transmissão de híbridos destas espécies de *Leishmania* assim como o aparecimento de focos de LV em zonas onde *P. papatasi* se encontra presente (Volf *et al.*, 2007).

O conhecimento das preferências hemáticas de uma dada espécie flebotomínica, permite interpretar melhor a transmissão da doença, independentemente de outros factores condicionantes. Neste estudo, foram analisadas, pela primeira vez em Portugal, as refeições sanguíneas de fêmeas flebotomínicas através da amplificação do gene *cyt B* pela técnica de PCR, a qual mostrou ser bastante vantajosa, uma vez que permitiu identificar com um elevado grau de especificidade e sensibilidade, os hospedeiros vertebrados nos quais as fêmeas flebotomínicas se tinham alimentado.

Embora as armadilhas CDC tenham sido colocadas em locais perto da actividade humana não foi detectada, nas fêmeas alimentadas, qualquer homologia com sangue humano. Seria também de esperar, que o cão fosse uma das preferências alimentares dos flebótomos, uma vez que, segundo Campino *et al.* (1995), a RA é o segundo foco de LCan mais importante de Portugal e porque estes animais estavam presentes na maioria dos biótopos prospectados. No entanto, também não foi detectada qualquer homologia, nas fêmeas de flebótomo alimentadas, com a sequência do gene cyt B do cão. Contudo, não sabemos se os cães, presentes nos biótopos estudados, ou nos arredores, tinham, ou não, qualquer tipo de protecção insecticida específica anti-flebótomo, nomeadamente coleiras ou “spot-on”.

Tal como num trabalho efectuado por Gradoni *et al.* (1983), *P. perniciosus* apresentou, neste estudo, um comportamento zoofágico alimentando-se maioritariamente em roedores. O facto de esta espécie não ter apresentado uma manifesta preferência trófica pelo Homem poderá justificar, no Algarve, a baixa incidência de LV. No entanto, segundo Bongiorno *et al.* (2003), esta espécie vectora é conhecida por se alimentar numa vasta variedade de reservatórios o que pode ter implicações epidemiológicas em áreas urbanas e peri-urbanas, onde as fêmeas de flebótomos, não tendo outros hospedeiros mamíferos disponíveis, podem adaptar-se e efectuar, mais frequentemente, refeições sanguíneas em cães e humanos. Contudo, foi interessante ter-se verificado, através da análise das refeições sanguíneas, que *P. perniciosus* se alimentou num gato. Esta ocorrência permite-nos, de certa forma, reflectir sobre a LF e pôr a hipótese de ser a referida espécie flebotomínica talvez o principal (único?) vector de *Leishmania* para o referido animal no nosso país. Este resultado está de acordo com o estudo realizado em Espanha por Colmenares *et al.* (1995) acerca das preferências desta espécie flebotomínica, onde se verificou que em todas as localidades prospectadas, os gatos serviram de fonte alimentar.

Embora a bibliografia descreva que as preferências hemáticas de *P. ariasi* incluem canídeos, bovinos, equídeos e roedores (Guy *et al.*, 1984), neste estudo, duas fêmeas de *P. ariasi* alimentaram-se em aves da espécie *Gallus gallus* e uma num réptil. A detecção de espécies de hospedeiros diferentes do descrito poderá estar associado à metodologia utilizada, uma vez que o estudo de Guy *et al.* (1984) foi realizado através de serologia, a qual apenas permite identificar os hospedeiros para os quais se utilizaram anticorpos específicos.

A implementação da identificação das refeições sanguíneas das fêmeas flebotômicas, através de técnicas de biologia molecular, é importante para a vigilância epidemiológica das leishmanioses uma vez que não só indica quais os hospedeiros preferenciais de cada espécie de flebótomo, mas também permite a identificação da existência de potenciais reservatórios que de outra forma, dificilmente seriam detectados.

Há um risco mundial permanente da re-emergência da leishmaniose devido ao aparecimento de novos factores de risco, ou ao súbito aumento dos factores previamente identificados. A permanente sensibilização baseada na contínua educação na saúde e a estreita vigilância incluindo sistemas de alerta precoces são cruciais para reduzir os riscos. Avanços em novas metodologias, como os sistemas de informação geográfica, podem contribuir positivamente para estes esforços. Alguns factores de risco podem ser diminuídos através da aplicação de estratégias de controlo adaptadas a cada entidade eco-epidemiológica, assegurando a continuidade e ajustando as estratégias a novas alterações ambientais, melhorando-as através de pesquisas específicas. Contudo, isto requer um grande comprometimento financeiro e político.

O risco da potencial introdução de novas espécies de *Leishmania* em Portugal a partir de viajantes e imigrantes do Norte de África e do subcontinente Indiano, não deve ser negligenciado, uma vez que os vectores existem no nosso país, enfatizando a necessidade do desenvolvimento de vigilância epidemiológica sobre os vectores e reservatórios de *Leishmania*. A vigilância epidemiológica nos focos de infecção de leishmaniose, através da monitorização periódica da abundância relativa, da densidade e outros aspectos vectoriais das espécies flebotômicas, assim como, a realização de estudos epidemiológicos e a notificação obrigatória dos casos de leishmaniose humana e canina, associadas a uma coordenação multidisciplinar entre a saúde e outros factores governamentais, como a educação, agricultura, água, floresta e outras fontes naturais, são cruciais para prevenir e controlar os principais factores de risco na introdução e disseminação de novas espécies de leishmaniose na Região do Algarve.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABONNENC E., 1972. Les Phlébotomes de la Région Éthiopienne (Diptera, Psychodidae). *Mémoires de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Paris*, **55**: 289.
- ABRANCHES P., CAMPINO L., SANTOS-GOMES G. M., 1998. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. *Acta Médica Portuguesa*, **11** (10): 871-875.
- ABRANCHES P., CONCEIÇÃO-SILVA F. M., SILVA-PEREIRA M. C. D., 1984. Kala azar in Portugal. V. The silvatic cycle in the enzootic endemic of Arrábida. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **87**: 197-200.
- ABRANCHES P., PIRES C., CONCEIÇÃO-SILVA F., SILVA-PEREIRA M., GOMES G., 1987. O kala-azar em Portugal. VI. Inquérito epidemiológico realizado na Região Metropolitana de Lisboa: Interpretação da estrutura e dinâmica do foco endémico. *Jornal das Ciências Médicas de Lisboa*, **151**: 364-379.
- ABRANCHES P., PIRES C., 1980. O Kala-Azar em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, **3**: 203-207.
- ABRANCHES P., SAMPAIO-SILVA M., SANTOS-GOMES G., AVELINO I., PIRES C., CONCEIÇÃO-SILVA F., SEIXAS-LOPES A., SILVA-PEREIRA M., JANZ J., 1992. Kala-azar in Portugal. VII. Epidemiological survey in Alijó (endemic region of Alto-Douro). *Research and Reviews in Parasitology*, **52**: 121-124.
- ADINI I., JACOBSON R. L., KASAP M., SCHLEIN Y., JAFFE C. L., 1998. Species-specific detection of *Leishmania* in sandflies using an enzyme-linked immunisorbent assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**: 35-37.
- AFONSO M., CAMPINO L., CORTES S., ALVES-PIRES C., 2005. The Phlebotomine sand flies of Portugal- XIII. Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrábida leishmaniasis focus. *Parasite*, **12**: 69-72.
- ALCAIDE M., RICO C., RUIZ S., SORIGUER R., MUÑOZ J., FIGUEROLA J., 2009. Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. *PLoS ONE* **4** (9): 7092.
- ALVARES D., 1910. Um caso de kala-azar infantil em Lisboa. *Medicina Contemporânea*, **13**: 90-91.
- ALVAR D., SILVA E., 1911. Sobre a frequência do kala-azar nos cães em Lisboa. *Medicina Contemporânea*, **14**: 97.
- ALVAR J., APARICIO P., ASEFFA A., BOER M., CAÑAVATE C., DEDET J., GRADONI L., HORST R., LÓPEZ-VÉLEZ R., MORENO J., 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, **21**: 334-359.

- ALVAR J., CAÑAVATE C., GUTIÉRREZ-SOLAR B., JIMÉNEZ M., LAGUNA F., LÓPEZ-VÉLEZ R., MOLINA R., MORENO J., 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus co-infection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, **10** (2): 298-319.
- ALVAR J., CAÑAVATE C., MOLINA R., MORENO J., NIETO J., 2004. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, **57**: 1-88.
- ALVAR J., MOLINA R., SAN ANDRÉS M., TESOURO M., NIETO J., VITUTIA M., GONZÁLEZ F., SAN ANDRÉS M. D., BOGGIO J., RODRÍGUEZ F., SÁINZ A., ESCACENA C., 1994. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **88**: 371-378.
- ALVES-PIRES C., CAPELA R. A., PENA I. 1997. Os Flebótomos de Portugal. IX. Presença de *Sergentomyia minuta* (Rond., 1843) na Selvagem Grande (Madeira). *Boletim da Sociedade Portuguesa de Entomologia*, **178**: 389-395.
- ANTOINE, J. C., 1994. Leishmanies cycle et adaptations. *Médecine et Armées*. **22** (1): 23-27.
- ANTONIOU M., HARALAMBOUS C., MAZERIS A., PRATLONG F., DEDET J. P., SOTERIOU K., 2009. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *The Lancet Infectious Diseases*, **9** (2): 76-77.
- ARANSAY A., SCOUlica E., TSELENTIS Y., 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (5): 1933-1938.
- ASCHER F., PIRES C., CAPELA M., AGUIAR P., 1997. Effect protecteur d'un spray insecticide contre *Phlebotomus perniciosus* vecteur de leishmaniose. *Conference Nationale des Vétérinaires Spécialisées en Petits Animaux*. C.N.V.S.P.A., 22 Novembro, Paris.
- ASHFORD D., BOZZA M., FREIRE M., MIRANDA J. C., SHERLOCK I., EULALIO C., LOPES U., FERNANDES O., DEGRAVE W., BARKER J. R., BADARÓ R., DAVID J. R., 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **53**: 251-255.
- ASHFORD D., DAVID J., FREIRE M., DAVID R., SHERLOCK I., EULÁLIO M., SAMPAIO D., BADARÓ R., 1998. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**: 53-57.
- ASHFORD, R. W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1269-1281.
- ASHFORD R. W., DESJEUX P., DERAADT P., 1992. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today*, **8**: 104-105.
- ATLAS DO AMBIENTE DIGITAL. In: <http://www.dga.min-amb.pt/atlas/> Homepage da DGA (Direcção Geral do Ambiente).
- AZEVEDO J., 1960. Sobre o diagnóstico do kala-azar. *Jornal do Médico*, **43**: 265-272.
- BANETH G., AROCH I., 2008. Canine leishmaniasis. A diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, **175**: 14-15.

- BAÑULS A. L., HIDE M., PRUGNOLLE F., 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, **64**: 1-109.
- BASANO S. A., CAMARGO L. M. A., 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Review of Brazilian Epidemiology*, **7** (3): 328-337.
- BATES P. A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, **37** (10): 1097-106.
- BEACH R., KIILU G., LEEUWENBURG J., 1985. Modification of sand fly biting behavior by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **34**: 278-282.
- BEAVER, P. C., JUNG, R. C., CUPP, E. W., 1984. *Clinical Parasitology*. 9ª Ed. Lea e Febiger. Philadelphia.
- BEIER J. C., PERKINS P. V., WIRTZ R. A., KOROS J., DIGGS D., GARGAN T. P., KOECH D. K., 1988. Bloodmeal identification by direct enzymelinked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *Journal of Medical Entomology*, **25**: 9-16.
- BENIKHLEF R., PRATLONG F., HARRAT Z., SERIDI N., BENDALI-BRAHAM S., BELKAID M., DEDET J. P., 2001. Infantile visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* zymodeme MON-24 in Algeria. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **94** (1): 14-16.
- BETTINI S., GRADONI L., 1986. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insects of Science and its Application*, **7**: 241-245.
- BHATTARAI R., DAS M., 2009. Natural infection of *Phlebotomus argentipes* with *Leishmania* and other trypanosomatids in a visceral leishmaniasis endemic region of Nepal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **1179**: 1-6.
- BLACKBURN K., WALLBANKS K., MOLYNEUX D., LAVIN D., WINSTANLEY S., 1988. The peritrophic membrane of the female sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **82**: 613-619.
- BODET J., 1991. Los Phlebotomidae (Insecta: Diptera) de Barcelona en tanto que vectores de *Leishmania* Ross, 1903. Contribución a su conocimiento. *Tesis doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- BOGDAN C., RÖLLINGHOFF M., SOLBACH W., 1990. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitology Today*, **6**: 183-187.
- BOGDAN C., SCHÖNIAN G., BANULS A. L., HIDE M., PRATLONG F., LORENZ E., RÖLLINGHOFF M., MERTENS R., 2001. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical Infection Disease*, **32**: 302-306.
- BOGITSH B. J., CHENG, T. C., 1998. *Human Parasitology* (2<sup>nd</sup> ed.). San Diego: Academic Press., 95-112 pp.

- BONGIORNO G., HABLUTZEL A., KHOURY C., MAROLI M., 2003. Host preference of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica*, **88**: 109–116.
- BOREHAM P. F., 1975. Some applications of bloodmeal identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical diseases. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **78**: 83–91.
- BORJA-CABRERA G., BORJA-CABRERA G., MENDES A., SOUZA E., OKADA L., TRIVELLATO F., KAWASAKI J., COSTA A., REIS A., GENARO O., BATISTA L., PALATNIK M., PALATNIK-DE-SOUSA C., 2004. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, **22**: 2234-2243.
- BORJA-CABRERA G., PONTES N., SILVA V., SOUZA E., SANTOS W., GOMES E., LUZ K., PALATNIK M., PALATNIK-DE-SOUSA C., 2002. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine*, **20**: 3277-3284.
- BOURDEAU P., 1983. Elements pratiques du diagnostic de la leishmaniose. *Le Point Veterinaire*, **43**: 125-132.
- BRANDÃO-FILHO S. P., BRITO M. E., CARVALHO F. G., ISHIKAWA E. A., CUPOLILLO E., FLOETER-WINTER L., SHAW J. J., 2003. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **97**: 291–296.
- BRYCESSON A. M. D., 1996. Leishmaniasis. In: *Manson's Tropical Diseases*. Cook, GC & Zumba, A. Eds. WB Saunders. 20th ed., London, 1755 pp.
- BULLE B., MILLON L., BART J. M., GALLEGO M., GAMBARELLI F., PORTUS M., SCHNUR L., JAFFE C. L., FERNANDEZ-BARREDO S., ALUNDA J. M., PIARROUX R., 2002. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 3391-3397.
- CALHEIROS J., CASIMIRO E., ALMEIDA A., ALVES-PIRES C., COLLARES-PEREIRA M., CARDOSO M., SANTOS-SILVA M., AFONSO M., SOUSA R., 2006. Saúde Humana e implicações para o Turismo. In: Santos, F. D. e Miranda P.(eds). *Alterações Climáticas em Portugal. Cenários e Medidas de Adaptação. Projecto SIAM II*. Gradiva, Lisboa, 223-270 pp.
- CAMPINO L., ABRANCHES P., 2002. Leishmaniose cutânea. Uma doença rara em Portugal? *Acta Médica Portuguesa*, **15**: 387-390.
- CAMPINO L., 1998. Leishmanioses em Portugal. Características emergentes da epidemiologia e do diagnóstico. *Tese Doutorado*. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 192 pp.
- CAMPINO L., MAIA C., 2010. Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, **23** (5): 859-864.
- CAMPINO L., PRATLONG F., ABRANCHES P., RIOUX J., SANTOS-GOMES G., ALVES-PIRES C., CORTES S., RAMADA J., CRISTOVAO J., AFONSO M., DEDET J., 2006. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*, **11**: 1708-1714.



- CAMPINO L., RIÇA-CAPELA M., MAURÍCIO I., OZENSOY S., ABRANCHES P., 1995. O kala-azar em Portugal. IX. A região do Algarve: inquérito epidemiológico sobre o reservatório canino no concelho de Loulé. *Revista Portuguesa das Doenças Infecciosas*, **18**: 189-194.
- CAMPINO L., SANTOS-GOMES G.M., DEDET J. P., ABRANCHES P., 1994. The isolation of *Leishmania donovani* MON-18 from an AIDS patient in Portugal: possible needle transmission. *Parasite*, **1**: 391-392.
- CARDOSO L., SCHALLIG H., NETO F., KROON N., RODRIGUES M., 2004. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Tropica*, **91**: 95-100.
- CHICHARRO C., MORALES M. A., SERRA T., ARES M., SALAS A., ALVAR J., 2002. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **96** (1): 93-99.
- CHOW E., WIRTZ R. A., SCOTT T.W., 1993. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **9**: 196-205.
- CHUNG H. L., FENG L. C., FENG S. L., 1951. Observations concerning the successful transmission of kala-azar in North China by the bites of naturally infected *Phlebotomus chinensis*. *Peking Natural History Bulletin*, **19**: 302-326.
- COLEMAN R., ROBERT L., ROBERTS L., GLASS J., SEELEY D., LAUGHINGHOUSE A., PERKINS P., WIRTZ R., 1993. Laboratory evaluation of repellents against four anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) and two phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, **30**: 499-502.
- COLLINS F., PASKEWITZ S., 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Biochemical and Molecular Biology*, **5**: 1-9.
- COLMENARES M., PORTÚS M., BODET J., DOBANO C., GÁLLEGO M., WOLF M., SEGUÍ G., 1995. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *Journal of Medical Entomology*, **32**: 229-233.
- CORTES S., AFONSO M., ALVES-PIRES C., CAMPINO L., 2007. Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, **13**: 1431-1432.
- CORTES S., ROLÃO N., RAMADA J., CAMPINO L., 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **98**: 12-17.
- CROSET H., RIOUX J. A., JUMINER B., TOUR S., 1966. Présence de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 en Tunisie et nouvelle mention de *Phlebotomus chadlii* Rioux, Juminer et Gibily. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, **43**: 547-551.
- DABA S., DABA A., SHEHATA M.G., EL SAWAF B.M., 2004. A simple micro-assay method for estimating blood meal size of the sandfly, *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Egypt Society Parasitology*, **34**: 173-182.

- DANTAS-TORRES, F., 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, **149**: 139-146.
- DAVID J., STAMM L., BEZARRA H., SOUZA R., KILLICK-KENDICK R., LIMA J., 2001. Deltamethrin-impregnated plastic dog collars have a potent anti-feeding effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**: 839-847.
- DAVIDSON R., 1999. Leishmaniasis in humans, with particular reference to leishmaniasis with a canine reservoir. In Canine Leishmaniasis: an update. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum* Barcelona, Spain: 72-77.
- DE BARJAC H., LARGET L. & KILLICK-KENDRICK R., 1981. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis, serotype H-14 pour larves de phlébotomes vecteurs de leishmanioses. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **14**: 484-489.
- DEDET J. P., 1993. *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. *Annales de l'Institut Pasteur*, **4**: 3-25.
- DEDET J. P., 1994. Leishmanioses dans le Monde. *Médecine et Armées*, **22**: 7-10.
- DEDET J. P., 2000. Les leishmanioses: actualités. *La Presse Médicale*, **29**: 1019-1026.
- DEDET J. P., PRATOLONG F., 2003. Leishmaniasis in: *Mason's tropical diseases*. Cook GC in Zumba Eds., WB Saunders. 21<sup>th</sup> ed. London, 1833-1864 pp.
- DEPAQUIT J., LÉGER N., FERTÉ H., 1998. Le statut taxinomique de *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917, vecteur de *Leishmania tropica* (Wright, 1903) et *Phlebotomus similis* Perfiliev, 1963 (Diptera - Psychodidae). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **91**: 346-352.
- DEREURE J., 1999. Réservoirs de leishmanies. Dedet P., ed. *Les Leishmanioses*. Second edition. Paris: AUPELF-UREF, 109-130.
- DESJEUX J. P., ALVAR J., 2003. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **97** (1): 3-15.
- DESJEUX J. P., 1992. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Statistics Quarterly*, **45** (2-3): 267-275.
- DESJEUX J. P., 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, **14**: 417-423.
- DESJEUX J. P., 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **95**: 239-243.
- DESJEUX J. P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology and Microbiology of Infectious Diseases*, **27**: 305-318.
- DIETZE R., BARROS G., TEIXEIRA L., HARRIS J., MICHELSON K., FALQUETO A., COREY R., 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, **25**: 1240-1242.

- Di MUCCIO T., MARINUCCI M., FRUSTERI L., MAROLI M., PESSON B., GRAMICCIA M., 2000. Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus Larrousius (Diptera, psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. *Insect Biochemical and Molecular Biology*, **30** (5): 387-393.
- DUJARDIN J., CAMPINO L., CAÑAVATE C., DEDET J., GRADONI L., SOTERIA DOU K., MAZERIS A., OZBEL Y., MARLEEN BOELAERT M., 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, **14**: 1013-1018.
- DUPREY Z., STEURER F., ROONEY J., KIRCHHOFF L., JACKSON J., ROWTON E., DCHANTZ P., 2006. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerging Infectious Diseases*, **12**: 440-446.
- DYE C., 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **55**: 125-130.
- EL TAI N. O., OSMAN O. F., EL FARI M., PRESBER W., SCHÖNIAN G., 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **94** (5): 575-579.
- ELTOUM I. A., ZIJLSTRA, ALI M. S., GHALIB H. W., SATTI M. M., ELTOUM B., EL-HASSAN A. M., 1992. Congenital kala-azar and *Leishmania* in the placenta. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **46**: 57-62.
- FRANÇA C., 1918. Apontamentos para o estudo dos "*Phlebotomus*" portugueses. *A Medicina Moderna*, **295**: 67-68.
- GARNHAM, P. C. C., 1965. The *Leishmania*, with special reference of the role of animal reservoirs. *American Zoologist*, **5**: 141-151.
- GASPAR, J., 1979. Portugal em mapas e números. Edição Livros Horizonte, Coleção Espaço e Sociedade, **1**: 189.
- GAUD J., 1947. Phlébotomes du Maroc, *Bulletin de la Société Natural de Maroc*, **27**: 207-212.
- GAVGANI A., HODJATI M., MOHITE H., DAVIES C., 2002. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *The Lancet*, **360**: 374-379.
- GIRÃO, A. A., 1941. Geografia de Portugal. Edição ilustrada. Edição Portuguesa Editora S.A.R.L., Porto, 447- 1941.
- GOMES L. A., DUARTE R., LIMA D. C., DINIZ B. S., SERRÃO M. L., LABARTHE N., 2001. Comparison between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatilis* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and human hosts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**: 693-695.
- GOMEZ B., SANCHEZ E., FELICIANGELI M. D., 1998. Man-vector contact of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in north-central Venezuela as assessed by blood meal identification using dot-ELISA. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **14**: 28-32.

- GOSSAGE S., ROGERS M., BATES P., 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, **33**: 1027-1034.
- GRADONI L., GRAMICCIA M., POZIO E., 1984. Status of the taxonomy of *Leishmania* from the Mediterranean basin. *Parasitology*, **26**: 289-297.
- GRADONI L., POZIO E., BETTINI S., GRAMICCIA M., 1980. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). (III) The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **74**: 421-422.
- GRADONI L., POZIO E., GRAMICCIA M., MAROLI M., BETTINI S., 1983. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**: 427-431.
- GRAMICCIA M., GRADONI L., 2007. The leishmaniasis in Southern Europe. In: W. Takken, B.G.J. Knols, editors. *Emerging pests and Vector-Borne Diseases, Ecology and control of vectorborne diseases*, Wageningen Academic Publishers, **1**: 75-95.
- GRAMICCIA M., GRADONI L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, **35**: 1169-1180.
- GUERNAOUI S., BOUSSAA S., *et al.*, 2006. Nocturnal activity of Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in Chichacua, Morocco. *Parasitology Research*, **98**: 184-188.
- GUY M. W., KILLICK-KENDRICK R., GILL G. S., RIOUX J. A., BRAY R. S., 1984. Ecology of leishmaniasis in the South of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cévennes by bloodmeal analyses. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **59**: 449-458.
- HALBIG P., HODJATI M., MAZOLOUMI-GAVGANI A., MOHITE H., DAVIES C., 2000. Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect dogs from sandfly bites. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**: 223-226.
- HANDMAN E., BULLEN D. V., 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, **18** (8): 332-334.
- HAOUAS N., PESSON B., BOUDABOUS R., DEDET J. P., BABBA H., RAVEL C., 2007. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**: 1054-1059.
- HASHIGUCHI Y., GOMEZ E. A. L., 1991. A review of leishmaniasis in Ecuador. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, **25**: 64-76.
- HERWALDT B., 1999. Leishmaniasis. *The Lancet*, **354**: 1191-1199.
- HUNTER F. F., BAYLY R., 1991. ELISA for identification of blood meal source in black flies (Diptera: Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*, **28**: 527-532.

- JACOBSON R. L., EISENBERGER C. L., SVOBODOVÁ M., BANETH G., SZTERN J., CARVALHO J. N., NASEREDDIN A., EL FARI M., SHALOM U., VOLF P., VOTYPKA J., DEDET J. P., PRATLONG F., SCHÖNIAN G., SCHNUR L. F., JAFFE C. L., WARBURG A., 2003. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. *Journal of Infection Diseases*, **188**: 1065–1073.
- KALYANASUNDARAM M., SRINIVASAN R., SUBRAMANIAN S., PANICKER K., 1994. Relative potency of DEPA as a repellent against sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Medical and Veterinary Entomology*, **8**: 68-70.
- KAMHAWI S., 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, **22**: 439-445.
- KATO H., GOMEZ E., CÁCERES A. G., UEZATO H., MIMORI T., HASHIGUCHI Y., 2010. Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **7**: 814-826.
- KAUL S., WATTAL B., BHATNAGAR V., MATHUR K., 1978. Preliminary observations on the susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* and *Ph. papatasi* to DDT in two districts of North Bihar (India). *Journal of Communicable Diseases*, **10**: 208-211.
- KILLICK-KENDRICK R., LEANEY A., READY P., MOLYNEUX D., 1997. *Leishmania* in flebotomide sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. *Biological Sciences*, **196**: 105-115.
- KILLICK-KENDRICK R., KILLICK-KENDRICK M., PINELLI E., REAL G., MOLINA R., VITUTIA M., CAÑAVATE M., NIETO J., 1994. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*, **1**: 311-318.
- KILLICK-KENDRICK R., 1991. *Leishmania*: intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **66** (1):71-74.
- KILLICK-KENDRICK R., 1987. Methods for the study of phlebotomine sandflies. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press, Inc. Ltd. (Ed.), London, **1**: 473-497.
- KILLICK-KENDRICK R., MOLYNEUX D., ASHFORD R., 1974. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. *Biological Sciences*, **187**: 409-419.
- KILLICK-KENDRICK R., 2002. Phlebotomine sand flies: biology and control. In *World Class Parasites Volume 4, Leishmania*. J. P. Farrell (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrech/London, 193 pp.
- KILLICK-KENDRICK R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, **4** (1): 1-24.
- KILLICK-KENDRICK R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, **17**: 279-289.
- KILLICK-KENDRICK R., WARD R., 1981. Ecology of *Leishmania*. *Parasitology*, **82**: 143-152.

- KISHORE K., KUMAR V., KESARI S., DINESH D., KUMAR A., DAS P., BHATTACHARYA S., 2006. Vector control in leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research*, **123**: 467-472.
- KOEHLER K., STECHELE M., HETZEL U., DOMINGO M., SCHÖNIAN G., ZAHNER H., BURKHARDT E., 2002. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, **109**: 9-17.
- KUHLS K., MAURICIO I. L., PRATLONG F., PRESBER W., SCHÖNIAN G., 2005. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and Infection*, **7**: 1224-1234.
- LAISON R., SHAW J. J., 1987. Evolution. Classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis. Biology and Medicine*. W. Peteres & R. Killick-Kendrick (Ed.). Academic Press, Londres, **1**: 1-120.
- LANE R. P., ALEXANDER B. 1988. Sandflies (Diptera: Phlebotominae) of the Canary Islands. *Journal of Natural History*, **22**: 313-319.
- LANG T., WARBURG A., SACKS D. L., CROFT S. L., LANE R. P., 1991. Transmission and scanning EM-immunogold labeling of *Leishmania major* lipophosphoglycan in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *European Journal of Cell Biology*, **55**: 362-372.
- LANOTTE G., RIOUX J. A., PERIÈRES J., VOLLHARDT Y., 1979. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. *Annales de Parasitology Humaine et Comparée*. 10, **54**: 277-295.
- LAWYER P. G., NGUMBI P. M., ANJILI C. O., ODONDO S. O., MEBRATHU, Y. M., GITHURE J. I., KOECH, D. K., ROBERTS C. R., 1990. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **43**: 31-43.
- LAWYER P. G., YOUNG D. G., BUTLER J. F., AKIN D. E., 1987. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, **24**: 347-355.
- LÉGER N., DEPAQUIT J., 1999. Les phébotomes. Dedet J. P., ed. *Les Leishmanioses*. First edition. Paris: AUPELF-UREF, 89-108.
- LÉGER N., PERROTEY S., FERTÉ H., PESSON B., MORILLAS-MARQUEZ F. & BARRALE T., 1995. Présence de *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921 à Fuerteventura (Canaries, Espagne). *Parasite*, **2**: 187-189.
- LEWIS D. J., 1982. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History)* **45**: 121-209.
- LEWIS D. J., 1978. The phebomotive sandflies (Diptera: Psychodidae) of Oriental Region. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*, **37**: 217-343.
- LIRA R., SUNDAR S., MAKHARIA A., KENNEY R., GAM A., SARAIVA E., SACKS D., 1999. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *Journal of Infectious Diseases*, **180**: 564-567.

- LÓPEZ-VÉLEZ R., 2003. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **97** (1): 143-147.
- MAGILL A. J., GRÖGL M., GASSER R. A., SUN W., OSTER C. N., 1993. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *New England Journal Medicine*, **328** (19): 1383-1387.
- MAIA C., AFONSO M., DIONÍSIO L., CAMPINO L. 2007. Leishmaniasis survey in Algarve Region, Portugal: canine reservoir and phlebotomine sandflies. *X Congresso Ibérico de Parasitologia*. Madrid, Espanha. (www.ucm.es/info/CIP2007.madrid).
- MAIA C., AFONSO M. O., NETO L., DIONÍSIO L., CAMPINO L., 2009. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *Journal of Vector Borne Diseases*, **46**: 268–272.
- MAIA C., GOMES J., CRISTÓVÃO J., NUNES M., MARTINS A., REBÊLO E., CAMPINO L., 2010. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, **5442**: 1-5.
- MAIA C. 2008. Interação Parasita-Hospedeiro e susceptibilidade de *Leishmania infantum* a fármacos. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. *Tese de Doutoramento*. 301 pp.
- MAIA C., NUNES M., CAMPINO L. 2008. Importance of cats on zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, **8**: 555-560.
- MANCIANTI F., GRAMICCIA M., GRADONI L., PIERI S., 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **82**: 566-567.
- MANSO J., DIAS F., NETO E., 1998. Leishmaníase cutânea localizada. *Acta Pediátrica Portuguesa*, **29**: 21-24.
- MARET P.J., 1923. A note on the capture of a *Phlebotomus perniciosus* male in Jersey. *Transations of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **17**: 267.
- MAROLI M., KHOURY C., BIANCHI R., D'URSO V., RAINS G., RUTA F., 1998. Distribution of *Phlebotomus sergenti* (Diptera: Pshichodidae) in eastern Sicily, Italy. *Parasitologia*, **40** (1): 99.
- MAROLI M., MIZZON V., SIRAGUSA C., D'OORAZI A., GRADONI L., 2001. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**: 358-363.
- MAROLI M., PENNISI, M. G., DI MUCCIO, T., KHOURY C., GRADONI L., GRAMICCIA M., 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, **145**: 357-360.
- MAROLI M., ROSSI L., BALDELLI R., CAPELLI G., FERROGLIO E., GENCHI C., GRAMICCIA M., MORTARINO M., PIETROBELLI M., GRADONI L., 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine International Health*, **13**: 256–264.

- MARTÍN-SÁNCHEZ J., PINEDA J.A., MORILLAS-MÁRQUEZ F., GARCÍA- GARCÍA J.A., ACEDO C., MACÍAS J., 2004. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **70** (5): 545-548.
- MARTINEZ-ORTEGA E., 1988. Caracterización de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) en el sureste de la Península Ibérica. *Revista Ibérica de Parasitología*, **48**: 79-87.
- MARTINEZ S., VANWAMBEKE S. O., READY P., 2007. Linking changes in landscape composition and configuration with sandfly occurrence in southwest France. *Fourth International Workshop on the Analysis of Multi-temporal Remote Sensing Images*, 2007.
- MAURÍCIO I., STOTHARD J., MILES M., 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, **16**: 188-189.
- MCCARTHY, J.J., CANZIANI, O. F., LEARY, N.A., DOKKEN, D. J., WHITE, K.S., 2001. Climate change 2001. Impacts, adaptation, and vulnerability. Cambridge, Cambridge Universit press.
- MEIRA M.T.V., FERREIRA T. G., 1944. Espèces de phlébotomes de Lisbonne et de ses environs. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, **1**: 269-287.
- MENCKE N., VOLF P., VOLFOVA V., STANNECK D., 2003. Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitology Research*, **90**: 108-111.
- MINODIER P., PIARROUX R., GAMBARELLI F., JOBLET C., DUMON H., 1997. Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**: 2551-2555.
- MIRÓ G., CARDOSO L., PENNISI M., OLIVA G., BANETH G. 2008. Canine leishmaniosis - New concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, **24**: 371-377.
- MIRÓ G., GÁLVEZ R., MATEO M., MONTROYA A., DESCALZO M., MOLINA R., 2007. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Veterinary Parasitology*, **143**: 375-379.
- MOLINA R., AMELA C., NIETO J., SAN-ANDRÉS M., GONZÁLEZ F., CASTILLO J. A., LUCIENTES J., ALVAR J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transations of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**: 491-493.
- MOLINA R., LOHSE J., NIETO J., 2001. Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sand fly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Veterinary Therapeutics*, **2**: 261-267.
- MOLINA R., LOHSE J. M., PULIDO F, LAGUNA F, LÓPEZ-VÉLEZ R., ALVAR J., 1999. Infection of sand flies by humans coinfectd with *Leishmania infantum* and human imunodeficiency. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **60**: 51-53.
- MOLINA R., MIRÓ G., GÁLVEZ R., NIETO J., DESCALZO M. 2006. Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *The Veterinary Record*, **159**: 206-209.



- MOLYNEUX D. H., JEFFERIES D., 1986. Feeding behaviour of pathogen infected vectors. *Parasitology*, **92**: 721–736.
- MOLYNEUX D., KILLICK-KENDRICK R., 1987. Morphology ultrastructure and life cycles. In "The leishmaniasis in biology and medicine". W. Peters & R. Killick-Kendrick (Eds.). Academic Press, London. 941 pp.
- MORAL L., RUBIO E. M., MOYA M. 2002. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacantí region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **96** (2): 129-132.
- MORILLAS-MARQUEZ F., CASTILLO-REMIRO A., UBEDA-ONTIVEROS J. M., 1984. Nuevos datos sobre *Phlebotomus fortunatarum* Ubeda Ontiveros y cols, 1982 y presencia de *Sergentomyia fallax* (Parrot, 1921) (Diptera, Phlebotomidae) en el Archipelago Canario. *Revista Ibérica de Parasitología*, **44**: 29-36.
- MOULAHEM T., FENDRI A. H., HARRAT Z., BENMEZDAD A., AISSAOUI K., AHRAOU S., ADDADI K., 1998. Contribution à l'étude des phlébotomes de Constantine: espèces capturées dans un appartement urbain. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **91**: 344-345.
- MUKHERJEE S., HASSAN M. Q., GHOSH A., GHOSH K. N., BHATTACHARYA A., ADHYA S., 1997. Short report: *Leishmania* DNA in *Phlebotomus* and *Sergentomyia* species during a kala-azar epidemic. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **57** (4): 423-425.
- MUKHOPADHYAY A., HATI A., CHAKRABORTY S., SAXENA N., 1996. Effect of DDT on *Phlebotomus* sandflies in Kala-Azar endemic foci in West Bengal. *The Journal of Communicable Diseases*, **28**: 171-175.
- MURRAY H., BERMAN J., DAVIS C., SARAIVA N., 2005. Advances in Leishmaniasis. *The Lancet*, **366**: 1561-1577.
- MYSKOVA J., SVOBODOVA M., BEVERLEY S. M., VOLF P., 2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infection*, **9**: 317–324.
- NASCIMENTO D., COSTA J., FIORI B., VIANA G., FILHO M., ALVIM A., BASTOS O., NAKATANI M., REED S., BADARÓ R., SILVA A., BURATTINI M., 1996. The epidemiological determinant aspects in the maintenance of visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **29**: 233-240.
- NGO K. A., KRAMER L. D., 2003. Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order specific primers. *Journal of Medical Entomology*, **40**: 215–222.
- NITZULESCU V., 1930. Sur le *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Sa présence en France. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **8**: 530-539.
- NUNES C., LIMA V., PAULA H., PERRI S., ANDRADE A., DIAS F., BURATTINI M., 2008. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, **153**: 19-23.

- OCHSENREITHER S., KUHLS K., SCHAAR M., PRESBER W., SCHÖNIAN G., 2006. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 495-503.
- OGUSUKU E., PEREZ J. E., PAZ L., NIETO E. MONJE J, GUERRA H., 1994. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **88**: 329–335.
- PARROT L., 1936. Notes sur les phlébotomes. XVIII - Sur la présence en Algérie de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir et sur la spermathèque de cette espèce. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, **14**: 48-49.
- PARROT L., 1917. Sur un nouveau phlébotome algérien *Phlebotomus sergenti*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **10**: 564-567.
- PARVIZI P., MAZLOUMI-GAVGANI A. S., DAVIES C. R., COURTENAY O., READY P. D., 2008. Two *Leishmania* species circulating in the Kaleybar focus of 'infantile visceral leishmaniasis', northwest Iran: implications for deltamethrin dog collar intervention. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **102** (9): 891-97.
- PENER H. & WILAMOWSKY A., 1996. Susceptibility of larvae of the sandfly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to *Bacillus sphaericus*. *Bulletin of Entomological Research*, **86**: 173-175.
- PERROTEY S., 1994. Les phlébotomes (Diptera, Phlebotomidae) des Îles Canaries (Espagne). *Diplôme d'Études Approfondies*, Paris, 63 pp.
- PIARROUX R., AZAIEZ R., LOSSI A., REYNIER P., MUSCATELLI F., GAMBARELLI F., FONTES M., DUMON H., QUILICI M., 1993. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **49**: 364-369.
- PIMENTA P., MODI G., PEREIRA S., SHAHABUDDIN M., SACKS D. 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, **115**: 359-369.
- PIMENTA P., TURCO S., MCCONVILLE M., LAWYER P., PERKINS P., SACKS D., 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, **256**: 1812-1815.
- PIRES C. A., CAMPINO L., AFONSO M. O., SANTOS-GOMES G., DEDET J. P., PRATLONG F., 2001. The phlebotomines of Portugal. X–Natural infestation of *Phlebotomus perniciosus* by *Leishmania infantum* MON-1 in Algarve. *Parasite*, **8**: 374–375.
- PIRES C. A., CAPELA R. A., 1996. Phlébotomes du Portugal. VIII - Première mention de *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *sergenti* Parrot, 1917 à l'île de Madère. *Parasite*, **3**: 94.
- PIRES, C. A., 1979. Contribuição ao conhecimento da distribuição e bioecologia dos flebotomos em Portugal (Diptera, Psychodidae). *Boletim da Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais*, **19**: 197-210.
- PIRES C. A., 1984. Les phlébotomes de Portugal. I – Infection naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, par *Leishmania* dans le foyer zoonotique de l' Arrabida (Portugal). *Annales de Parasitology Humaine et Comparée*. **559**: 521-524.

- PIRES C. A., 1988. Os flebótomos de Portugal (Diptera, Psycodidae). III. Exofilia e endofilia de *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus perniciosus* no foco de kala-azar de Arrábida. Actas, *III Congresso Ibérico de Entomologia*, Dezembro, Granada, 821-828.
- PIRES, C. A., 2000. Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal. *Tese Doutoramento*. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 228 pp.
- PIRES C. A., TANG Y., KILLICK-KENDRICK R., 1997. *Didilia* sp. (Tetradonematidae: Mermithoidea: Nematoda) a parasite of *Phlebotomus sergenti* in Portugal. *Parasite*; **2**: 191-192.
- PRATLONG F., RIOUX J. A., MARTY P., FARAUT-GAMBARELLI F., DEREURE J., LANOTTE G., DEDET J. P., 2004. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *Journal of Clinical Microbiology*, **42** (9): 4077-4082.
- RAMALHO-ORTIGÃO J., KAMHAWI S., JOSHI M., REYNOSO D., LAWYER P., DWYER D., SACKS D., VALENZUELA J., 2005. Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Molecular Biology*, **14**: 703-712.
- RAVEL C., CORTES S., PRATLONG F., MORIO F., DEDET J. P., CAMPINO L., 2006. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology*, **36**: 1383-1388.
- READY P., 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. In: S de la Roque, editor. Climate change: the impact on the epidemiology and control of animal diseases. *Review of Science and Technology of International Epizooties*, **27** (2): 399-412.
- READY P., 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveillance*, **15** (10): 1-10.
- REBEKAH J., DOUGLAS E. N., 2005. Identification of Mammalian Blood Meals in mosquitoes by a Multiplexed Polymerase Chain Reaction targeting Cytochrome b. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73** (2): 336-342.
- REBELO, M. E., 1993. Nota prévia acerca de um lobo, *Canis lupus* L., 1758, infectado por *Leishmania* sp. em Portugal. *Veterinária Técnica*, **42**.
- RÉS J. F., 1957. Contribuição para o conhecimento da leishmaniose em Portugal. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, **14**: 527-545.
- RIOUX, J. A., COLUZZI M., BAIN O., BAUDOY, J. P., 1964. Présence de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 en Italie du Nord. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **57**: 966-971.
- RIOUX J. A., GOLVAN Y. J., CROSET H., TOUR S., HOIUN R., ABONNENC, E., PETITDIDIER M., VOLHARDT Y., DEDET J. P., ALBARET J. L., LANOTTE G., QUILLICI M., 1969. Épidémiologie des leishmanioses dans le Sud de la France. *Monographie de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médical*, n°37. Ministère des Affaires Sociales, Paris, **220**.
- RIOUX J. A., LANOTTE G., PRATLONG F., DEREURE J., JARRY D., MORENO G., KILLICH-KENDRICK R., PERIERES J., GUILVARD E., BELMONTE A., PORTUS M., 1985. La leishmaniose cutane autochtone dans le Sud-Est de la France. Resultats d'une enquete epidemiologique dans les Pyrnes-Orientales. *Medecine et Maladies Infectieuses*, **11**: 650-656.

- ROGERS M., BATES P., 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PloS Pathogens*, **3** (6): 818-825.
- ROGERS M., CHANCE M., BATES P. 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, **124**: 495-508.
- ROGERS M., NIKOLAEV A., FERGUSON M., BATES P., 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, **430**: 463-467.
- ROHER S. P., MICHELOTTI E.F., TORRI A.F., HAJDUK S.L., 1987. Transcription of kinetoplast DNA minicircles. *Cell*, **49**: 625-632.
- ROLÃO N., MARTINS M., JOÃO A., CAMPINO L., 2005. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, **12**: 183-186.
- ROMESER W. S., 1996. The vector alimentary system, in: Beaty, J. B., Marquart, W. C. (Eds.), *The Biology of Disease Vectors*, 298–330 pp.
- RONDANI, C., 1843. Italicæ generis Hebotomi, Rndn., ex insectis dipteris: fragmentum septimum ad inserviendam dipterologiam italicam. *Annales de la Société Entomologique* (France), **1**: 263-267.
- ROSSI E., BONGIORNO G., CIOLLI E., DI MUCCIO T., SCALONE A., GRAMICCIA M., GRADONI L., MAROLI M., 2008. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Tropica*, **105**: 158–165.
- ROSYPAL A., ZAJAC A., LINDSAY D., 2003. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, **33**: 921-937.
- SACKS, D., KAMHAWI, S., 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, **55**: 453-483.
- SÁDLOVÁ, J., 1999. The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta of the Society of Zoology of Bohemia*, **63**: 331-366.
- SAMPAIO-SILVA M. L., CAMPINO L., AVELINO I., SANTOS-GOMES G. M., SEIXAS- LOPES A., 1993. Kala-azar em Portugal. VIII. Estudo epidemiológico da leishmaniose canina em três concelhos do Alto-Douro. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, **16**: 241-244.
- SARAIVA E., BARBOSA A., SANTOS F., BORJA-CABRERA G., NICO D., SOUZA L., MENDES-AGUIAR C., SOUZA E., FAMPA P., PARRA L., MENZ I., DIAS J., OLIVEIRA S., PALATNIK-DE-SOUSA C., 2006. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine*, **24**: 2423-2431.
- SCHALLIG H. D., OSKAM L., 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine and International Health*, **7**: 641-651.
- SCHLEIN Y., 1993. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today*, **7**: 255-258.

- SCHLEIN Y., JACOBSON R., SHLOMAI J., 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. *Biological Sciences*, **245**: 121-126.
- SCHLEIN Y., WARBURG A., 1986. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *Journal of Medical Entomology*, **23**: 11-15.
- SCHÖNIAN G., MAURICIO I., CUPOLILLO, 2010. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*, **26** (10): 466-469.
- SCHÖNIAN G., MAURICIO I., GRAMICCIA M., CAÑAVATE C., BOELAERT M., DUJARDIN J. C., 2008. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends in Parasitology*, **24** (3): 135-142.
- SCHÖNIAN G., NASEREDDIN, A., DINSE, N., SCHWEYNOCH, C., SCHALLIG, H., PRESBER, W., JAFFE, C. L., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **47**: 349-358.
- SCHREY C. F., PIRES C. A., MACVEAN D. W., 1989. Distribution of phlebotomine sandflies and the rate of their infection with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal. *Medical and Veterinary Entomology*, **3**: 125-130.
- SECCOMBE A.K., READY P.D., HUDDLESTON L.M., 1993. A Catalogue of Old World Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Occasional Papers on Systematic Entomology*, **8**: 1-57.
- SECUNDINO N., EGER-MANGRICH I., BRAGA E., SANTORO M., PIMENTA P., 2005. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. *Journal of Medical Entomology*, **42**: 928-938.
- SEMIÃO-SANTOS S., HARITH A., FERREIRA E., PIRES C., SOUSA C., GUSMÃO R., 1995. Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Trends in Parasitology*, **81**: 235-239.
- SERGEANT E., LOMBAARD J., QUILICHINI M., 1912. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bulletin de Société de Pathologie Exotique*, **5**: 93-98.
- SERGEANT E., SERGEANT E. T., PARROT L., DONATIEN A., LESTOQUARD F., 1933. Revue historique du problème de la transmission des leishmanioses. *Bulletin de Société de Pathologie Exotique*, **5**: 93-98.
- SERVIÇO METEOROLÓGICO NACIONAL, 1974. Atlas climatológico de Portugal Continental. Edição preliminar. Edição do Serviço Meteorológico Nacional, 67 pp.
- SHARMA R., BAHL L., 1996. Congenital Kala-azar: A case report. *Journal of Communicable Diseases*, **28**: 59-61.
- SHARMA U., SINGH S., 2008. Insect vectors of *Leishmania*: Distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*, **45**: 255-272.
- SHEHATA M., BAKER A., 1996. Mites infesting phlebotomine sandflies in southern Sinai, Egypt. *Medical and Veterinary Entomology*, **10**: 193-196.

- SINGH A., PAPADOPOULOU B., OUELLETTE M., 2001. Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*. *Experimental Parasitology*, **99**: 141-147.
- SMYTH A., GHOSH A., HASSAN M., BASU D., BRUIJN M., ADHYA S., MALLIK K., BARKER D., 1992. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, **105**: 183-192.
- SOLANO-GALLEGO L., MORELL P., ARBOIX M., ALBEROLA J., FERRER L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 560-563.
- SOLANO-GALLEGO L., RODRÍGUEZ-CORTÉS A., INIESTA L., QUINTANA J., PASTOR J., ESPADA Y., PORTÚS M., ALBEROLA J., 2007. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **76**: 676-680.
- SVOBODOVÁ M., ALTEN B., ZÍDKOVÁ L., DVORÁK V., HLAVACKOVÁ J., MYSKOVÁ J., SEBLOVÁ V., KASAP O. E., BELEN A., VOTÝPKA J., VOLF P., 2008. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *International Journal for Parasitology*, 1-6.
- SVOBODOVÁ M., VOTÝPKA J., NICOLAS L., VOLF P., 2003. *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. *Microbes and Infection*, **5**: 361-364.
- SYMMERS W. S. C., 1960. Leishmaniasis acquired by contagion. A case marital infection in Britain. *The Lancet*, **7116**: 127-132.
- TALMI-FRANK D., JAFFE C. L., NASEREDDIN A., WARBURG A., KING R., SVOBODOVÁ M., 2010a. *Leishmania tropica* in rock hyraxes (*Procavia capensis*) in a focus of human cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **82**: 814-818.
- TALMI-FRANK D., KEDEM-VAANUNU N., KING R., BAR-GAL G. K., EDERY N., JAFFE C. L., BANETH G., 2010b. *Leishmania tropica* Infection in Golden Jackals and red foxes, Israel. *Emerging infectious Diseases*, **16** (12): 1973-1975.
- TAVARES A., 1943. Leishmaniose cutânea autóctone. *Imprensa Médica*, **9**: 129-131.
- TESH R., 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **52**: 287-292.
- TETREAULT G., ZAYED A., HANAFI H., BEAVERS G., ZEICHNER B., 2001. Susceptibility of sand flies to selected insecticides in North Africa and the Middle East. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **17**: 23-27.
- TOWNZEN J.S., BROWER A.V. Z., JUDD D. D., 2008. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, **22**: 386-393.
- TROTZ-WILLIAMS L. A., TREES A. J., 2003. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *The Veterinary Record*, **152** (4): 97-105.

- VAN EYS G. J., SCHOONE G. J., KROON N. C., EBELING S. B., 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **51**: 133-142.
- VICENTE A., 1990. Kala-azar infantil. Dados epidemiológicos e incidência do kala-azar no Internamento de Pediatria do Hospital de Faro. *Revista Portuguesa das Doenças Infecciosas*, **13**: 173-182.
- VOLF P., BENKOVA I., MYSKOVA J., SADLOVA J., CAMPINO L., RAVEL C., 2007. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *International Journal for Parasitology*, **37**: 589-593.
- VOLF P., HAJMOVA M., SÁDLOVÁ, VOTYPKA J., 2004. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology*, **34**: 1221-1227.
- VOLF P., MYSKOVA J., 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology* **23** (3): 91-92.
- WALTERS L., IRONS K., GUZMAN H., TESH R. 1993. Formation and composition of the peritrophic membrane in the sand fly, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, **30**: 179-198.
- WASHINO R. K., TEMPELIS C. H., 1983. Mosquito host bloodmeal identification: methodology and data analysis. *Annual Review of Entomology*, **28**: 179-201.
- WHO, 1990. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO committee. WHO Technical Report Series, 793. *World Health Organization*, Geneve, 177 pp.
- WHO, 1995. Report on the consultative meeting on *Leishmania*/HIV co-infection. *WHO/LEIS*. Geneve, 95.35, (ed. <http://www.who.int>).
- WHO, 2000a. Leishmaniasis (Kala-azar). (ed. <http://www.who.int>).
- WHO, 2000b. Leishmania/HIV co-infection in south-western Europe 1990-1998: Retrospective analysis of 965 cases. Geneve, WHO/LEISH/2000.42.
- WHO, 2002. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **44** (77): 365-372. (<http://www.who.int/wer>)
- WHO, 2010. Leishmaniasis: background information. A brief history of the disease. WHO. 2009. ([www.who.int/leishmaniasis/en](http://www.who.int/leishmaniasis/en)).
- YUVAL B. & WARBURG A., 1989. Susceptibility of adult phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) to *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **83**: 195-196.
- ZHI-BIAO X., BLANCQ S., EVANS D., PETERS W., 1984. The characterization by isoenzyme electrophoresis of *Leishmania* isolated in the people's Republic of China. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **78**: 689.